



## ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ  
(IV)

Μελέτη υδρόλυσης και ζύμωσης του υδροθερμικά κατεργασμένου  
αχύρου με χρήση πιλοτικών θερμοενζύμων και του στελέχους F3 του  
μύκητα *Fusarium oxysporum*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Νταβέλλας Ρολάντ

Επιβλέπων : Τόπακας Ευάγγελος

Λέκτορας Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2014



## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου από τον Φεβρουάριο του 2012 έως και τον Φεβρουάριο του 2013. Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της προϋδρόλυσης του θερμικά προκατεργασμένου αχύρου με χρήση θερμοενζύμων καθώς και η επίδρασης του ενζυμικού συστήματος μύκητα *Fusarium oxysporum* στην υδρόλυση και στη ζύμωση του προκατεργασμένου αχύρου σίτου (PWS) για την παραγωγή αιθανόλης.

Η διεργασία της προϋδρόλυσης πραγματοποιήθηκε στους 55<sup>0</sup>C για 6 h για τρεις διαφορετικές συνθήκες με ενζυμικό φορτίο 3, 5 και 7 mg/grDM σε αντιδραστήρα υγροποίησης – προϋδρόλυσης ο οποίος σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε στο εργαστήριο μας. Η αρχική περιεκτικότητα σε ξηρή μάζα ήταν 23%. Η ρευστοποίηση για το δείγμα με το ενζυμικό φορτίο 7 mg/gDM ολοκληρώθηκε πριν τις 6h. Για το δείγμα με το ενζυμικό φορτίο 5 mg/gDM οι 6h επαρκούν και η ρευστοποίηση γίνεται σε ικανοποιητικό βαθμό. Τέλος για το δείγμα με το ενζυμικό φορτίο 3 mg/g DM η ρευστοποίηση είναι σε πολύ μικρά επίπεδα. Επιλέξαμε τα ένζυμα με ενζυμικό φορτίο 5 mg/g DM διότι έχουμε ικανοποιητική υδρόλυση κ δεν ξεπεράσαμε το όριο των 10 mg/g DM όταν προσθέσαμε τα υπόλοιπα ένζυμα (*Fusarium oxysporum*, celluclast), για τη διαδικασία της ζύμωσης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ζύμωση με ταυτόχρονη υδρόλυση (SSF) του προϋδρολυμένου αχύρου με χρήση κυττάρων και ενζύμων του *Fusarium oxysporum* και εμπορικών ενζύμων Celluclast– Novozyme σε διαφορετικά ποσοστά ξηρής μάζας 10 και 15% και με διαφορετικό ενζυμικό φορτίο σε κάθε πείραμα, 3 και 5 mg/g DM. Σε όλα τα πειράματα υπήρχε κ η προσθήκη ενζύμων thermomix με ενζυμικό φορτίο 5mg/gDM. Διαπιστώθηκε ότι τα ένζυμα του *Fusarium oxysporum* μπορούν να πραγματοποιήσουν υδρόλυση ταυτόχρονα με τη ζύμωση αλλά με μικρότερη απόδοση κατά 10 με 12% από ότι τα ένζυμα Celluclast για περιεκτικότητα σε ξηρή μάζα 10%. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρήθηκε για ενεργότητα ενζύμου 3mg/gDM και περιεκτικότητα σε ξηρή μάζα 15 % , διαφορά της τάξεως του 21%. Για ενεργότητα 5mg/g και περιεκτικότητα σε ξηρή μάζα 15% η διαφορά ήταν της τάξεως του 16 %. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παραγωγή αιθανόλης αυξάνεται με αύξηση του ποσοστού της ξηρής μάζας του μίγματος που πρόκειται να ζυμωθεί και αύξηση του ενζυμικού φορτίου.

This thesis has been prepared in Biotechnology Laboratory, School of Chemical Engineering, National Technical University from February 2012 until February 2013. The aim of this work was to study the hydrolysis thermally pretreated straw using hot enzymes and the effect of the enzyme system fungus *Fusarium oxysporum* hydrolysis and fermentation the pretreated wheat straw (PWS) to produce ethanol.

The process of pre hydrolysis performed at 55°C for 6 h for three different conditions with enzyme load 3, 5 and 7 mg / gDM in Reagents Liquefaction - pre hydrolysis which was designed and constructed in our laboratory. The original content of dry mass was 23%. The liquefaction of the sample with enzyme load to 7 mg / gDM completed before 6h. For the sample to enzyme load 5 mg / gDM the 6h sufficient and liquefaction is satisfactorily. Finally the sample with enzyme load to 3 mg / g DM the realization is very small levels. We chose the enzymes enzyme load 5 mg / g DM because we have good hydrolysis and not surpassed the threshold of 10 mg / g DM when we added other enzymes (*Fusarium oxysporum*, Celluclast), for the fermentation process.

Then, fermentation was performed by simultaneous hydrolysis (SSF) of pre hydrolyzed straw using cells and enzymes of the *Fusarium oxysporum* and commercial enzymes Celluclast- Novozyme different dry mass percentages of 10 and 15% and with a different enzyme load in each experiment, 3 and 5 mg / g DM. In all experiments was in addition thermomix enzymes with enzyme load 5mg / gDM. It was found that the enzymes of the *Fusarium oxysporum* can perform hydrolysis simultaneously with fermentation but with less efficiency by 10 to 12% of that of Celluclast enzyme 10% content of dry mass. The major difference was observed for enzyme activity 3mg / gDM and content dry mass of 15%, a difference of 21%. For activity 5mg / g and content dry mass of 15% the difference was around 16%. The results showed that ethanol production is increased by increasing the proportion of the dry mass of the mixture to be fermented and increasing the enzyme load.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Βιοκαύσιμα – Βιοαιθανόλη.....	8
Εισαγωγή .....	8
1.1 Παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης.....	12
1.2 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία .....	13
1.3 Βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς.....	13
1.4 Παραγωγή Βιοκαυσίμων με Πυρόλυση Βιομάζας... ..	15
1.5 Αγροτικά Παραπροϊόντα .....	16
1.5.1 Μελέτες .....	18
1.6 Βιοαιθανολη.....	20
1.7 Τεχνολογίες παραγωγής βιοαιθανόλης .....	22
1.7.1 Ξεχωριστή σακχαροποίηση και ζύμωση (SHF) .....	23
1.7.2 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση(SSF).....	24
1.7.3 Άμεση μικροβιακή μετατροπή (CBP ) .....	26
1.8 Διαδικασία Παραγωγής Αιθανόλης.....	28
1.9 Ο Μύκητας <i>Fusarium oxysporum</i> .....	31
Κεφάλαιο 2: Άχυρο Σίτου.....	33
2.1 Εισαγωγή.....	34
2.2 Το άχυρο σιταριού ως πιθανή πρώτη ύλη για 2 <sup>ης</sup> γενιάς βιοκαύσιμα.....	35
2.3 Προεπεξεργασία αχύρου σιταριού .....	35
2.3.1 Στόχοι της προεπεξεργασίας του αχύρου σίτου .....	35
2.3.2 Φυσική Επεξεργασία.....	36
2.3.3 Φυσικοχημική Επεξεργασία.....	37
2.3.3.1 Έκρηξη Ατμού .....	37

2.3.3.2 Εκρηξη Αμμωνιακών Ιοντών.....	38
2.3.3.3 Οξινή Υδρολύση.....	38
2.3.4 Χημική Επεξεργασία.....	39
2.3.4.1 Οξειδωτικοί Παράγοντες .....	39
2.3.4.2 Υγρή Οξείδωση (WO).....	39
2.3.5 Βιολογική Επεξεργασία.....	40
<b>Πειραματικό μέρος.....</b>	<b>41</b>
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 :Υλικά και Μέθοδοι.....	42
3.1 Πηγές άνθρακα - Πρώτες Ύλες.....	42
3.1.1 Το άχυρο σίτου .....	42
3.1.2 Χημικά και διαλύματα .....	42
3.1.3 Μικροοργανισμοί .....	42
3.1.4 Αποστείρωση.....	43
3.1.5 Εμβόλιο βιοαντιδραστήρα .....	43
3.2 Βιοαντιδραστήρας .....	44
3.3 Παραλαβή κυττάρων .....	45
3.4 Ενζυμικά συστήματα.....	45
3.4.1 Ενζυμα <i>Fusarium oxysporum</i> .....	45
3.4.2 Celluclast – Novozyne.....	46
3.4.3 Thermomix.....	46
3.5 Μετρήσεις ενζυμικών ενεργοτήτων .....	47
3.5.1 Κυτταρινάσες.....	47
3.5.2 Ενδογλυκανάσες .....	47
3.5.3 β-Γλυκοζιδάσες .....	48
3.6 Μετρήσεις αιθανόλης .....	49
3.7 Ιξωδομετρία.....	50
3.7.1 Ιξώδες και ρυθμός διάτμησης.....	51

3.8 Υγροποίησης και παρουσίαση του Mixer.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αποτελέσματα .....	53
4.1 Στάδια προϋδρόλυσης.....	54
4.2 Προυδρόλυση 3 mg/g DM.....	56
4.3 Προυδρόλυση 5 mg/g DM.....	57
4.4 Προυδρόλυση 7 mg/g DM.....	59
4.5 Σύγκριση .....	61
4.6 Παραγωγή αιθανόλης .....	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Σχολιασμός –Προτάσεις .....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	70

## Εισαγωγή

Τα βιοκαύσιμα είναι καύσιμα που προέρχονται από βιολογικές διεργασίες και στόχο έχουν να αντικαταστήσουν ολικά ή εν μέρει τα συμβατικά καύσιμα. (Lois et al.)2007

Ειδικότερα, όπως ορίζει ο Νόμος 3468/2006, Βιοκαύσιμα θεωρούνται τα ακόλουθα,καύσιμα:

**Βιοντίζελ** (πετρέλαιο βιολογικής προέλευσης) είναι οι μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (ΜΛΟ – FAME, fatty acid methyl ester ) που παράγονται από φυτικά ή ζωικά έλαια και λίπη και είναι ποιότητας πετρελαίου ντίζελ, για χρήση ως Βιοκαύσιμο.

**Βιοαιθανόλη** είναι η αιθανόλη που παράγεται από Βιομάζα ή από βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων, για χρήση ως Βιοκαύσιμο.

**Βιοαέριο** είναι το καύσιμο αέριο που παράγεται από Βιομάζα ή βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων, το οποίο μπορεί να καθαριστεί και να αναβαθμιστεί σε ποιότητα φυσικού αερίου, για χρήση ως Βιοκαύσιμο, ή το ξυλαέριο.

**Βιομεθανόλη** είναι η μεθανόλη που παράγεται από Βιομάζα, για χρήση ως Βιοκαύσιμο.

**Βιο-ETBE** είναι ο αιθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας (ETBE) που παράγεται από βιοαιθανόλη, για χρήση ως Βιοκαύσιμο. Το κατ' όγκο ποσοστό Βιο-ETBE που υπολογίζεται ως Βιοκαύσιμο είναι 47% επί του συνόλου του.

**Βιο-MTBE** είναι ο μεθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας (MTBE) που παράγεται από μεθανόλη, για χρήση ως Βιοκαύσιμο. Το κατ' όγκο ποσοστό Βιο-MTBE που υπολογίζεται ως Βιοκαύσιμο είναι 36% επί του συνόλου του

Η πρώτη ύλη των βιοκαυσίμων ονομάζεται βιομάζα (Berzegiannh et al). Η βιομάζα μπορεί να είναι, είτε αγροτικά παραπροϊόντα, είτε φυτά που καλλιεργούνται για την



παραγωγή βιοκαυσίμων. Το πιο σημαντικό στοιχείο στη παραγωγή βιοκαυσίμων είναι η σύσταση της βιομάζας.

Πίνακας 1. Περιεκτικότητα υδρογονανθράκων σε διάφορους τύπους βιομάζας

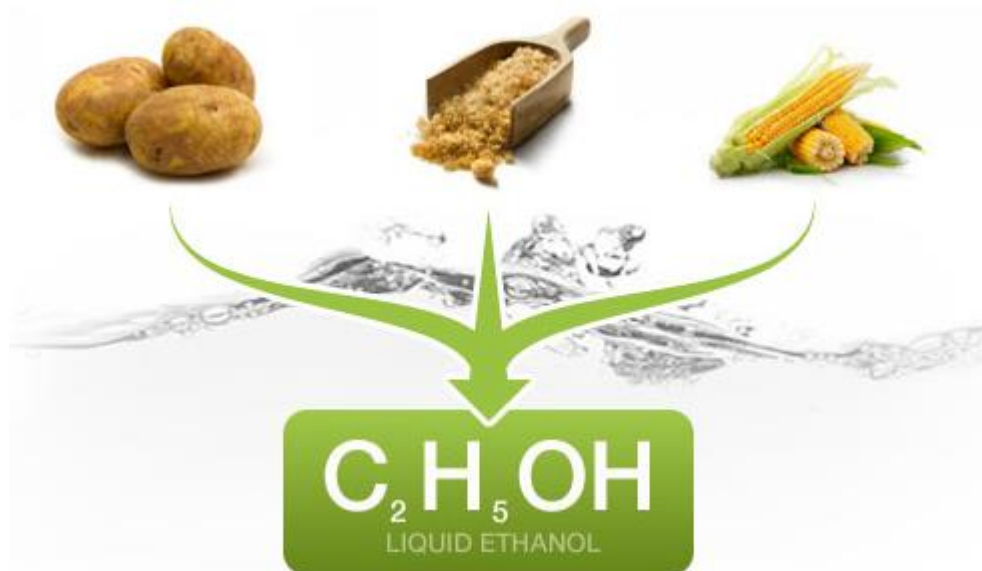
	<u>Υδρογονάνθρακες (% ισοδύναμο ζάχαρης)</u>					<u>Μη-υδρογονάνθρακες</u>	
	<u>Γλυκόζη</u>	<u>Μαννόζη</u>	<u>Γαλακτόζη</u>	<u>Ξυλόζη</u>	<u>Αραμπινόζη</u>	<u>Λιγνίνη</u>	<u>Στάχτη</u>
Σπάδικας Καλαμποκιού	39.0	0.3	0.8	14.8	3.2	15.1	4.3
Άχυρο σιταριού	36.6	0.8	2.4	19.2	2.4	14.5	9.6
Άχυρο ρυζιού	41.0	1.8	0.4	14.8	4.5	9.9	12.4
Τσόφλια ρυζιού	36.1	3.0	0.1	14.0	2.6	19.4	20.1
Υπολείμματα εκχύλισης σακχάρων	38.1	-	1.1	23.3	2.5	18.4	2.8
Σκληρό ξύλο	40.0	8.0	-	13.0	2.0	20.0	1.0
Μαλακό ξύλο	50.0	12.0	1.3	3.4	1.1	28.3	0.2

Πηγή: Lee, J.,1997

Από περιβαλλοντικής σκοπιάς, τα βιοκαύσιμα πιστεύεται ότι είναι φιλικότερα προς το περιβάλλον, δεδομένου ότι για να δημιουργηθούν καταναλώθηκε CO<sub>2</sub> οπότε δεν εισάγεται νέα ποσότητα CO<sub>2</sub> στον κύκλο του άνθρακα. Για την ανάπτυξη των φυτών βέβαια έχουν χρησιμοποιηθεί καύσιμα σε διάφορα στάδια της παραγωγής. Για τον λόγο αυτό έχει οριστεί ο Συντελεστής Ορυκτής Ενέργειας ως ο λόγος της ενέργειας που περιέχεται στο καύσιμο που παράγεται προς την ενέργεια που περιέχεται στα ορυκτά καύσιμα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του ενεργειακού φυτού [Χριστακόπουλος 2010]. Για την ανάπτυξη μεθόδων παραγωγής βιοκαυσίμων εκτός από περιβαλλοντικοί, υπάρχουν οικονομικοί κ πολιτικοί λόγοι, καθώς πολλές χώρες κάνουν προσπάθειες ανεξάρτησης από τα ορυκτά καύσιμα.

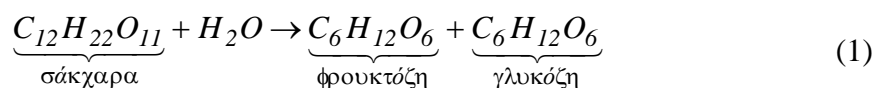
Οι δύο πιο κοινές μορφές υγρών βιολογικών καυσίμων είναι βιοαιθανόλη και βιοντήζελ, που χρησιμοποιούνται είτε καθαρά είτε σε μίγματα με το συμβατό πετρέλαιο κίνησης ή την βενζίνη [Gasparatos et al.2011].

Η βιοαιθανόλη παράγεται με τη μέθοδο της ενζυματικής υδρόλυσης. Για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν αγροτικά προϊόντα που περιέχουν σάκχαρα όπως ζαχαρότευτλο, ζαχαροκάλαμο, γλυκό σόργο, μελάσα κ.α., καθώς και άμυλο όπως δημητριακά, καλαμπόκι, πατάτα κτλ, ή κυτταρινικό υλικό (ξυλεία, υπολείμματα χαρτοβιομηχανίας) [Fischer et al., 2009].

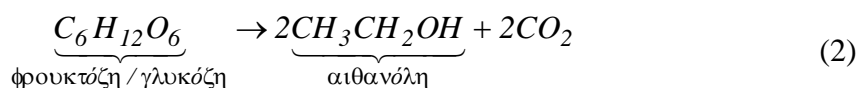


*Εικόνα 1:* πρώτες ύλες για τη βιοαιθανόλη

Κατά την ενζυματική υδρόλυση η βιομάζα υφίσταται τη διεργασία της υδρόλυσης κατά την οποία τα μεγάλα μόρια αμύλου και σακχαρόζης διασπώνται σε μικρότερα μόρια σακχάρων, τα οποία μπορούν να ζυμωθούν και να μετατραπούν σε αιθανόλη. Στη διεργασία της υδρόλυσης εισέρχεται και μαγιά η οποία περιέχει το ένζυμο invertase που δρα ως καταλύτης και βοηθά στην μετατροπή σακχάρων σε γλυκόζη και φρουκτόζη, όπως φαίνεται από την παρακάτω απλοποιημένη αντίδραση:



Η ζύμωση μορίων της ζάχαρης (φρουκτόζη και γλυκόζη) συντελεί στη παραγωγή αιθανόλης, μία μέθοδος πολύ διαδεδομένη στη βιομηχανία τροφίμων. Κατά τη ζύμωση, οι σακχαρομύκητες συντελούν στο μεταβολισμό της ζάχαρης απουσία οξυγόνου προς αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, όπως φαίνεται με την παρακάτω αντίδραση:



Αξίζει να σημειωθεί ότι η φύση της βιομάζας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της διεργασίας. Όπως προαναφέρθηκε, για την παραγωγή βιοαιθανόλης χρησιμοποιείται βιομάζα πλούσια σε άμυλο και σάκχαρα αλλά και λιγνοκυτταρινική βιομάζα. Γενικότερα το κυτταρινικό και ημικυτταρινικό υλικό μπορεί με τη χρήση κατάλληλων ενζύμων να μετατραπεί ως ένα μεγάλο ποσοστό σε βιοαιθανόλη [Χριστακόπουλος 2010].

Η διαδικασία μετατροπής της βιομάζας σε αιθανόλη περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1)Υδρόλυση των κυτταρινών κ ημικυτταρινών

Απο την υδρόλυση θα προκύψουν εξόζες (γλυκόζη,μαννόζη,γαλακτόζη) κ πεντόζες (ξυλόζη,αραβινόζη)

2)Ζύμωση των ζαχάρων για παραγωγή αιθανόλης.

Τα στάδια αυτά μπορούν να γίνουν ένα με ένα ενοποιημένο βιομετασχηματισμό. Μικροοργανισμοί όπως ο *Neurospora crassa* και ο *Fusarium oxysporum* έχουν μελετηθεί από το 1980 ότι μπορούν να συμμετέχουν στην ενοποιημένη διαδικασία. Οι οργανισμοί αυτοί έχουν την δυνατότητα να ζυμώσουν τα σάκχαρα κ να παράγουν ένζυμα για την υδρόλυση της λιγνοκυτταρικής πρώτης ύλης{Christakopoulos et al 1989}

### 1.1 Παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης

Πρώτος παγκόσμιος παραγωγός είναι οι Η.Π.Α. ,όπου χρησιμοποιούν ως πρώτη ύλη αραβόσιτο δυνητικής απόδοσης 50 εκατομμυρίων λιτρών,στο οποίο μπορούν να προστεθούν γεωργικά υπολείμματα ,ξύλο,στερεά δημοτικά απόβλητα κ ενεργειακές καλλιέργειες κ να φτάσει σε ποσότητα τα 300 εκατομμύρια λιτρα .Το ποσοστό των ορυκτών καυσίμων που μπορεί να αντικατασταθεί φτάνει το 30% [Δημητρόπουλος 2009]

Δευτερος παγκόσμιος παραγωγός .είναι η Βραζιλία, όπου από το 1975 ξεκίνησε ένα εθνικό πρόγραμμα προώθησης της αιθανόλης.Στη Βραζιλία χρησιμοποιούν ζαχαρότευτλα για την παραγωγή της αιθανόλης. Πλέον τα μισά αυτοκίνητα κινούνται αποκλειστικά με αιθανόλη ενώ τα υπόλοιπα με μίγμα βενζίνης-αιθανόλης 75%-25% (E25) κ η χώρα έχει καταστεί ενεργειακά αυτόνομη [ Filho 2000]

## 1.2 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

- Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία 2003/30/EK από το τέλος του 2010 το 5,75% της εγχώριας βενζίνης θα πρέπει να υποκατασταθεί από βιοαιθανόλη ή άλλο συμβατό με τη βενζίνη πρόσθετο
- Η οδηγία 2003/30/EK της 8<sup>ης</sup> Μαΐου 2003 <προώθηση της χρήσης των βιοκαυσίμων ή άλλων ανανεώσιμων καυσίμων για τις μεταφορές>, έθεσε τα θεμέλια για την προώθηση των εναλλακτικών καυσίμων στην Ε.Ε. (6)
- Η οδηγία 2003/96/EK της 27<sup>ης</sup> Οκτωβρίου εστιάζει κυρίως στη φορολογία που εφαρμόζεται στα βιοκαύσιμα. Αυτή η οδηγία τροποποιεί τον Κοινοτικό φόρο στην ενέργεια και τα ενεργειακά προϊόντα.
- Η οδηγία 2009/28/EK της 23<sup>ης</sup> Απριλίου 2009 εισάγει ένα νέο στόχο για την μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου στον τομέα των μεταφορών
- Η οδηγία 2009/30/EK της 23<sup>ης</sup> Απριλίου 2009 στοχεύει στη βελτίωση της ατμοσφαιρικής ποιότητας και τη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, μέσω περιβαλλοντικών προτύπων για τα καύσιμα.

## 1.3 Βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς

Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς είναι τα βιοκαύσιμα που παράγονται με πρωτοποριακές διεργασίες και από περισσότερους τύπους βιομάζας από ότι τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς. Τα κυριότερα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

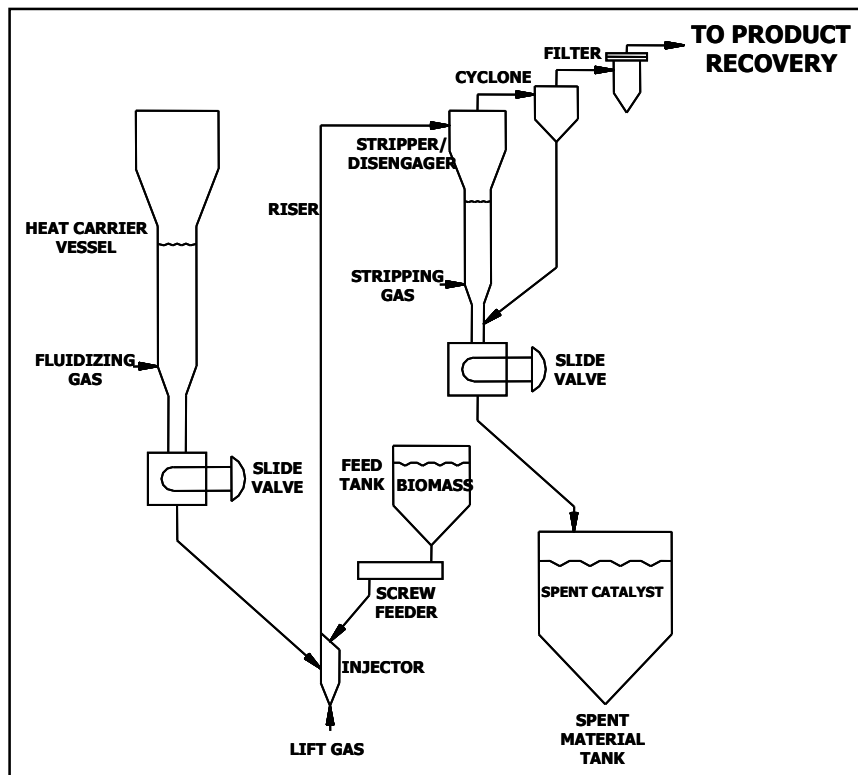
*Πίνακας2:* Πρωτοποριακά βιοκαύσιμα ή βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς(Πηγή Bezergiannh,lappas &Bounetakis 2009)

<b>Τύπος Βιοκαυσίμου</b>	<b>Ονομασία</b>	<b>Διεργασία</b>
Συνθετικά βιοκαύσιμα	Fischer-Tropsch Βιοντίζελ	Εξαέρωση, wgs, σύνθεση, HDC
	Αλκοόλη από αέριο σύνθεσης	Εξαέρωση, σύνθεση
	HTU ντίζελ	HTU, HDO, δύλιση
	Ντίζελ πυρόλυσης	Πυρόλυση, HDO, δύλιση
Βιομεθανόλη	Μεθανόλη	Εξαέρωση, wgs, σύνθεση
Βιοαιθανόλη	Αιθανόλη από κυτταρίνη	Υδρόλυση, Ζύμωση, απόσταξη
Βιο-MTBE	MTBE	Σύνθεση
Βιοδιμέθυλαιθέρας	DME	Εξαέρωση, wgs, σύνθεση
Βιουδρογόνο	Υδρογόνο από αέριο σύνθεσης	Εξαέρωση, wgs, απομάκρυνση CO <sub>2</sub>
Βιοαέριο	Φυσικό αέριο από αέριο σύνθεσης	Εξαέρωση, wgs, σύνθεση, απομάκρυνση CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O
	Συνθετικό φυσικό αέριο	Εξαέρωση

Στα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς ανήκουν τα συνθετικά βιοκαύσιμα που παράγονται από θερμοχημικές και καταλυτικές διεργασίες όπως πυρόλυση, εξαερίωση, και Fischer-Tropsch. Επίσης στην κατηγορία αυτή ανήκει και η βιοαιθανόλη που παράγεται από λιγνοκυτταρινικό υλικό (Bezergiannh,lappas &Bounetakis et al 2009). Το υδρογόνο από αέριο σύνθεσης καθώς και το βιοαέριο αποτελούν τα κύρια αέρια βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς (Kim 2004).

#### 1.4 Παραγωγή Βιοκαυσίμων με Πυρόλυση Βιομάζας

Η πυρόλυση βιομάζας είναι η διεργασία παραγωγής βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς που απασχολεί ερευνητικά το ΕΠΚΥ. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2 η βιομάζα έρχεται σε επαφή με άζωτο που μεταφέρει τον καταλύτη και ανέρχεται στον αντιδραστήρα (riser). Το προϊόν σε αέρια φάση περνά από ένα σύστημα κυκλώνων και φίλτρων από το οποίο διαχωρίζεται ο καταλύτης. Στη συνέχεια το αέριο προϊόν ψύχεται και αφού περάσει από ένα ισοσταθμιστή συλλέγεται το υγρό προϊόν (~85% κ.β.) το οποίο αποτελεί το βιοέλαιο που αποτελεί το παραγόμενο βιοκαύσιμο. (Kim 2004)



*Εικόνα 2:* πυρόλυση βιομάζας

## **1.5 Αγροτικά Παραπροϊόντα**

Η βιοαιθανόλη παράγεται κυρίως βιομηχανικά από ζαχαροκάλαμο στη Βραζιλία και άμυλο αραβοσίτου στις ΗΠΑ .Πάνω από το 90% της παγκόσμιας παραγωγής αιθανόλης προέρχεται από την εφαρμογή συγκεκριμένων καλλιεργειών (το 60% από ζαχαροκάλαμο και ζαχαρότευτλο, ενώ το υπόλοιπο 40% κυρίως από άμυλο αραβοσίτου) [Δημητρόπουλος 2009].

Γενικά, οι πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοαιθανόλης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τύπους: (i) σακχαρούχα υλικά, (ii) αμυλούχα υλικά και (iii) λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. [Kumar et al., 2006].

Η παραγωγή βιοαιθανόλης (l/tn) για διαφορετικά υλικά δίνεται από τον πίνακα 3(επόμενης σελίδας )



Πίνακας 3: Διαφορετικά υλικά για την παραγωγή βιοαιθανόλης και η συγκριτική τους παραγωγική δυνατότητα (Kumar et al., 2006)

<b>Υλικό</b>	<b>Παραγωγή βιοαιθανόλης (1/ton)</b>
Ζαχαροκάλαμο	70
Ζαχαρότευτλο	110
Γλυκιά πατάτα	125
Πατάτα	110
Μανιόκα (Cassava)	180
Καλαμπόκι	360
Ρύζι	430
Κριθάρι	250
Σιτάρι	340
Γλυκό σόργο	60
Υπολείμματα εκχύλισης σακχάρου και άλλη κυτταρική βιομάζα	280

Στα θετικά της βιοαιθανόλης συμπεριλαμβάνεται το γεγονός ότι εκτός από καλλιέργειες ,που δημιουργήθηκαν αποκλειστικά για αυτό το σκοπό ,παραγωγή μπορεί να υπάρξει κ από αγροτιά παραπροϊόντα. Οι Η.Π.Α. διαθέτουν μόλις το 3%

των παγκόσμιων αποθεμάτων πετρελαίου, αλλά παράγουν περισσότερο του 25% των αγροτικών παραπροϊόντων παγκοσμίως» (Riisgaard 2011 ) Πολλά από αυτά (πλούσια σε κυτταρίνες κ σάκχαρα ) που σε άλλες περιπτώσεις θα ήταν απλά ρύποι πλέων μπορούν να αξιοποιηθούν για παραγωγή βιοκαυσίμων.

Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, όπως τα γεωργικά υπολείμματα (άχυρο σίτου, στελέχη, κλαδιά, φύλλα), τα υπολείμματα επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων (υπολείμματα εκκοκκισμού βαμβακιού, πυρηνόξυλο, πυρήνες φρούτων κ.λ.π.) το ξύλο και οι ενεργειακές συγκομιδές, αποτελούν ένα ελκυστικό υλικό για την παραγωγή καυσίμων βιοαιθανόλης δεδομένου ότι διαθέτουν μεγάλο ποσοστό σε ζυμώσιμους υδρογονάνθρακες και είναι ο αφθονότερος αναπαραγωγίσιμος πόρος στη γη. Η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα θα μπορούσε να παράγει μέχρι 442 δισεκατομμύρια λίτρα βιοαιθανόλης το χρόνο [Bohlmann, 2006].

### 1.5.1 Μελέτες:

- Το άχυρο ρυζιού
- Παραπροϊόντα καλαμποκιού
- Πίτα φοινικοπυρήνων
- Καρπούζια
- Σπόροι του κριθαριού

Το άχυρο ρυζιού είναι ένα από τα άφθονα λιγνινοκυτταρινούχα απόβλητα στον κόσμο. Παράγονται ετησίως περίπου 731 εκατομμύρια τόνοι, τα οποία διανέμονται στην Αφρική (20.9 εκατομμύρια τόνοι), την Ασία (667.6 εκατομμύρια τόνοι), την Ευρώπη (3.9 εκατομμύρια τόνοι), την Αμερική (37.2 εκατομμύρια τόνοι) και την Ωκεανία (1.7 εκατομμύρια τόνοι). Αυτό το ποσό αχύρου ρυζιού μπορεί να παράγει 205 δισεκατομμύρια λίτρα βιοαιθανόλης το χρόνο, το οποίο είναι το μεγαλύτερο ποσό από ένα ενιαίο απόθεμα βιομάζας. [Karimi et al., 2006]. Οι βιοδιεργασίες για την παραγωγή αιθανόλης από ρύζι είναι η ξεχωριστή σακχαροποίηση και ζύμωση (SHF) και ταυτόχρονη σακχαροποίηση και η ζύμωση (SSF) (takano 2012 et al.)

Παραπροϊόντα καλαμποκιού (κοτσανια) υπόκεινται σε υδροθερμική κατεργασία στους 195 °C κ στη συνέχεια η διαδικασία ζύμωσης (SSF) με *S. cerevisiae* (Xu et al.2009)

Παραγωγή αιθανόλης από πίτα φοινικοκυρήνων (PKC).Η πίττα αυτή είναι το υπόλειμμα εκχύλισης φοινικέλαιου, το οποίο βρέθηκε να περιέχει 48,5% υδατάνθρακες συνολικά εκ των οποίων 35,2% είναι μαννάνη. Το κυτταρικό τοίχωμα υδρολυεται ενζυμικά για να ληφθούν μονοσακχαριτών που μπορούν να είναι υπόστρωμα σε διάφορες διεργασίες ζύμωσης.Η διαδικασία αυτή έχει βρεί εφαρμογή στη Μαλαισία όπου βιομάζα από φοινικόδεντρα μετατρέπονται σε υγρά βιοκαύσιμα. (Cervero et al 2009)

Τα ελαττωματικά καρπούζια εκτός από παραγωγή διατροφικών συμπληρωμάτων, μπορούν να χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Περίπου το 20% της ετήσιας σοδειάς καρπουζιού αφήνεται στο χωράφι εξαιτίας επιφανειακών δυσχρωμιών ή παραμορφώσεων. Ο χυμός αυτών των καρπουζιών είναι πηγή σακχάρων που μπορούν να υποστούν άμεσα ζύμωση. (Fish 2010)

Στην παραγωγή του “whiskey” κ αφού αποσταχθεί, στον άμβυκα μένουν οι σπόροι του κριθαριού που συνήθως ξηραίνονται και πωλούνται ως συστατικό ζωοτρόφων, καθώς και υγρά κατάλοιπα. Τα δύο αυτά συστατικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοβουτανόλης, ενός προϊόντος υψηλής αξίας. Το συγκεκριμένο βιοκαύσιμο έχει καλύτερες ιδιότητες από την αιθανόλη. Η ενεργειακή του πυκνότητα είναι υψηλότερη, πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να θέσει σε κίνηση συμβατικούς τετράχρονους κινητήρες χωρίς πρόσμειξη με άλλα καύσιμα και χωρίς τροποποίηση των μηχανών. (Tangney et al 2010)

## 1.6 Βιοαιθανολη

Η **βιοαιθανόλη** μπορεί να παραχθεί από πλήθος υδατανθράκων (με γενικό μοριακό τύπο:  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ).

Η ζύμωση της σακχαρόζης δίνει αιθανόλη . Αρχικώς η σακχαρόζη υδρολύεται προς γλυκόζη και φρουκτόζη.



σακχαρόζη            γλυκόζη            φρουκτόζη

Στη συνέχεια, η γλυκόζη και η φρουκτόζη μετατρέπονται σε αιθανόλη.

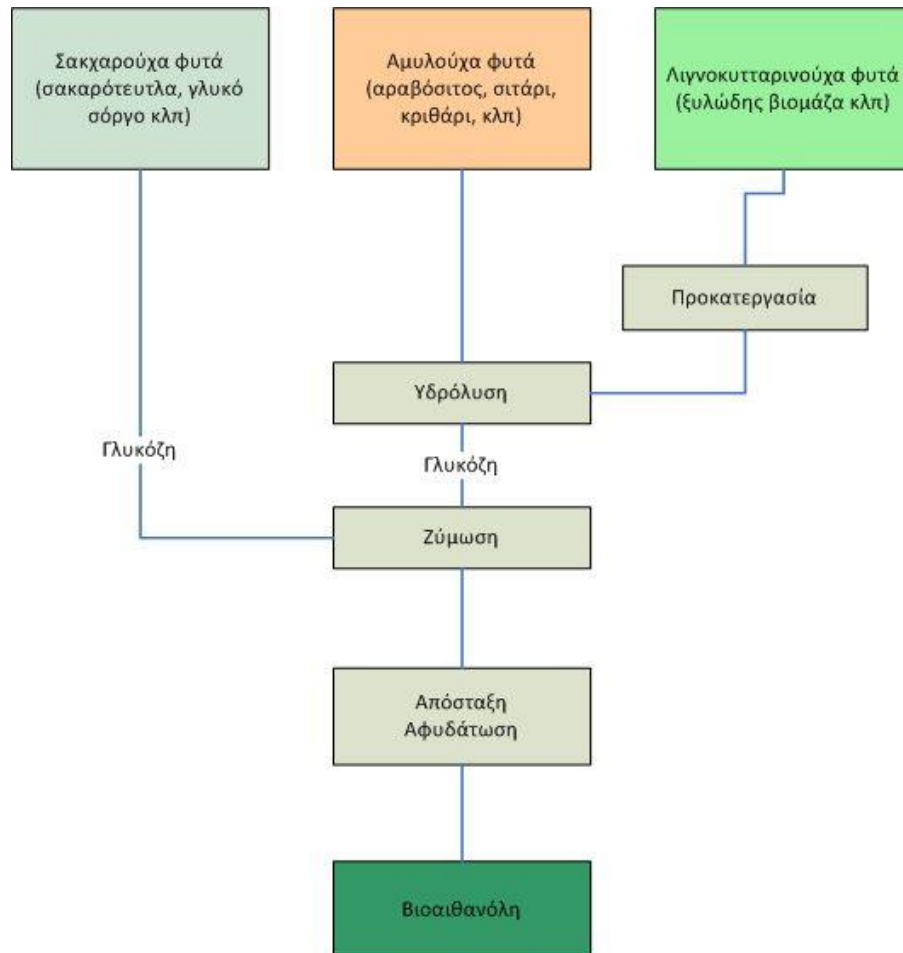


Το άμυλο μπορεί να μετατραπεί σε D-γλυκόζη, με τη βοήθεια του ενζύμου γλυκοαμυλάση. Αυτή η ενζυμική υδρόλυση ακολουθείται, στη συνέχεια, από τη ζύμωση, την απόσταξη και την αφυδάτωση με σκοπό την παραγωγή άνυδρης βιοαιθανόλης. Το καλαμπόκι, το οποίο περιέχει άμυλο σε ποσοστό 60-70%, αποτελεί τη βασική πρώτη ύλη παγκοσμίως για τη βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης από άμυλο.[A. Demirbas 2008]

Οι υδατάνθρακες (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) που βρίσκονται σε λιγνοκυτταρινούχα υλικά μπορούν να μετατραπούν σε βιοαιθανόλη αφού πρώτα λάβει χώρα η απολιγνινοποίηση, η επεξεργασία της ύλης με ατμό υπό πίεση και μία ελαφρά όξινη προ-υδρόλυση. Κατόπιν των σταδίων αυτών λαμβάνει χώρα η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση. Το σημαντικότερο στάδιο της παραγωγής βιοαιθανόλης αποτελεί το στάδιο της ενζυμικής επεξεργασίας της κυτταρίνης για την παραγωγή σακχάρων. Συνήθως του σταδίου αυτού προηγείται ένα στάδιο προκατεργασίας. (M. Galbe, G. Zacchi 2002)

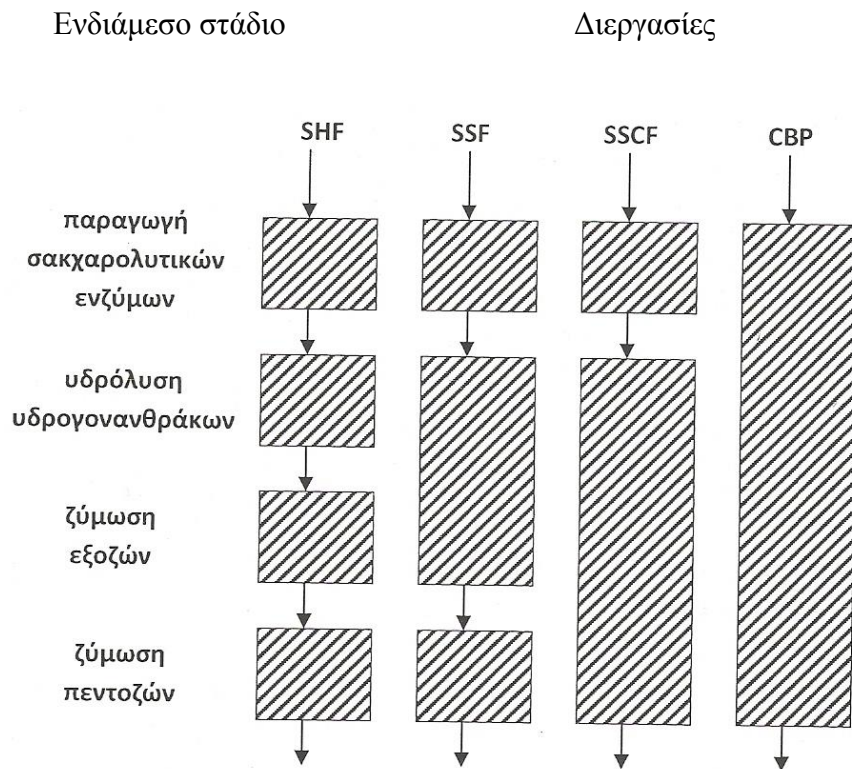
Μέσω της υδρόλυσης διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου των ημικυτταρινών και κυτταρινών με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε σάκχαρα: πεντόζες και εξόζες.

Αυτά τα σάκχαρα μπορούν στη συνέχεια να υποστούν ζύμωση για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι υδρόλυσης μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες: στη χημική υδρόλυση (με τη χρήση πυκνού ή αραιού οξέος) και στην ενζυμική υδρόλυση. Στη χημική υδρόλυση η προκατεργασία και η υδρόλυση μπορούν να υλοποιηθούν από κοινού σε ένα στάδιο.



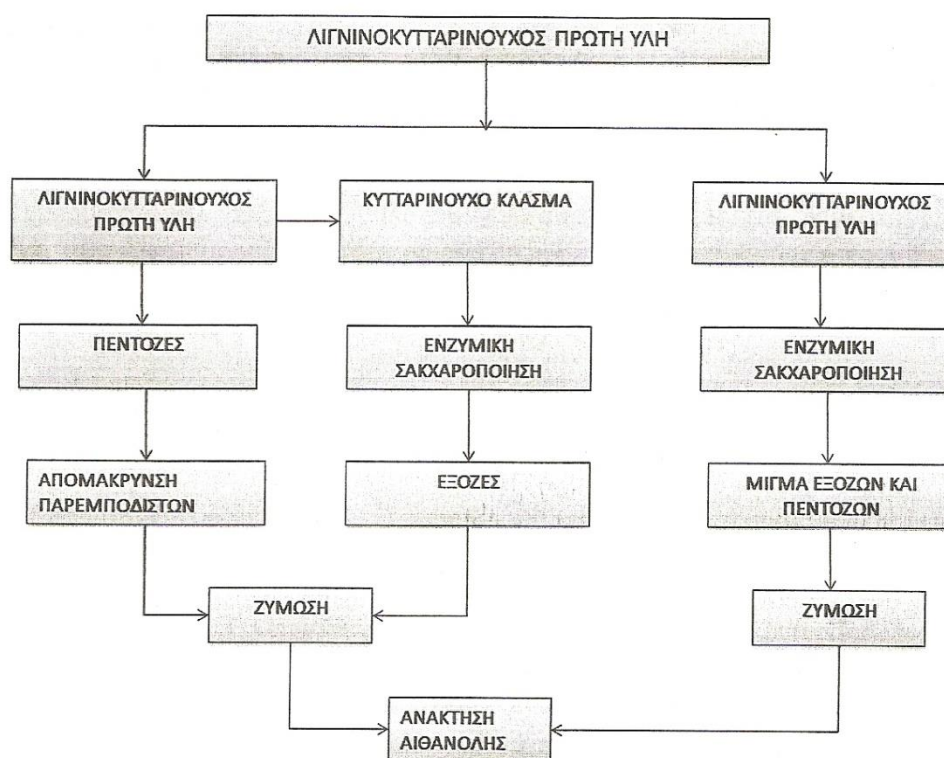
*Εικόνα 3:* Η διεργασία για τη παραγωγή βιοαιθανόλης, Πηγή [ Ye Sun, Jiayang Cheng 2002]

## 1.7 Τεχνολογίες παραγωγής βιοαιθανόλης



Σχήμα 2: Τεχνολογίες για τη παραγωγή βιοαιθανόλης και ενδιάμεσα στάδια [Lynd et al. 2002]

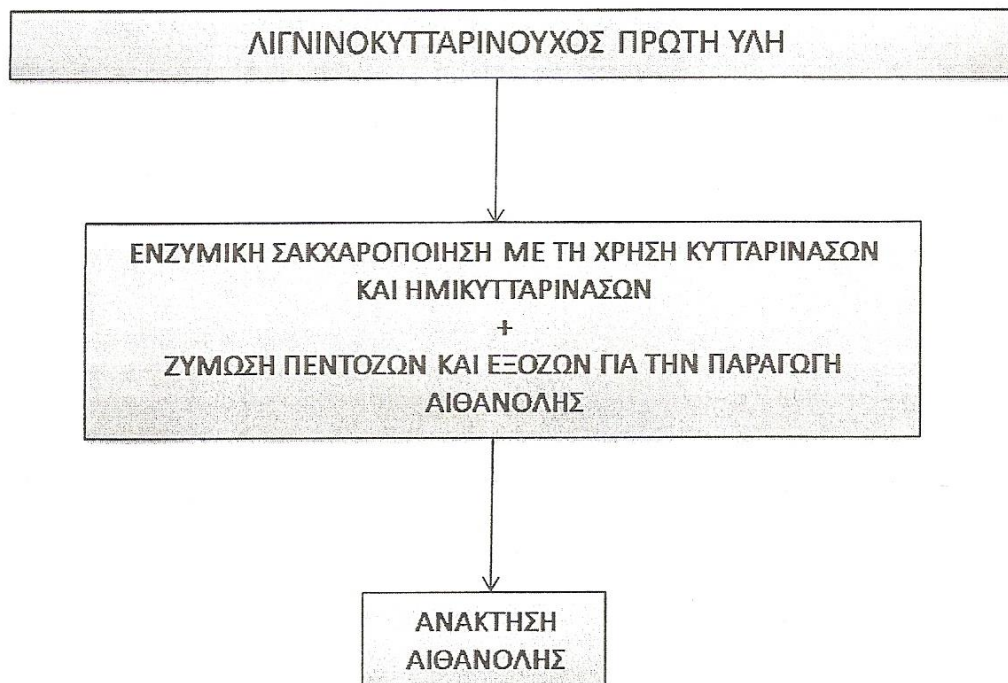
### 1.7.1 Ξεχωριστή σακχαροποίηση και ζύμωση (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF )



*Εικόνα 4:* SHF (Χριστακόπουλος 2010)

Η διεργασία αυτή, όπως προκύπτει και από το παραπάνω σχήμα, περιλαμβάνει τέσσερα ξεχωριστά στάδια και τέσσερις διαφορετικούς βιοκαταλύτες [Lynd et al. 2002]. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της διεργασίας είναι ότι το κάθε στάδιο μπορεί να διεξαχθεί στις βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και pH [Zaldivar et al.2001]. Ωστόσο, η συσσώρευση των τελικών προϊόντων της υδρόλυσης (γλυκόζη και κελλοβιόζη) παρεμποδίζει τη δράση των κυτταρινασών, ιδιαίτερα τη β-γλυκοζιδάση που καταλύει την υδρόλυση της κελλοβιόζης σε γλυκόζη. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση του ρυθμού σακχαροποίησης και της τελικής συγκέντρωσης των σακχάρων, που οδηγούν σε μικρότερη απόδοση αιθανόλης [Szcodrak and Fiedurek 1995, Alfani et al. 2000, Zaldivar et al.2001].

**1.7.2 Ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) και ταυτόχρονη σακχαροποίηση και συμμεταβολισμός (Simultaneous Saccharification and Cofermentation, SSCF)**



*Εικόνα 5 :* SSF (Χριστακόπουλος 2010)

Η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση συγχωνεύει την υδρόλυση της κυτταρίνης και τη ζύμωση των εξοζών σε ένα στάδιο, ενώ η παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων και η ζύμωση των πεντοζών που προκύπτουν από την υδρόλυση της ημικυτταρίνης πραγματοποιούνται σε δύο επιπρόσθετα ξεχωριστά στάδια. Με τη ταυτόχρονη σακχαροποίηση και τον συμμεταβολισμό, πραγματοποιείται η παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων, και σε ένα δεύτερο στάδιο διεξάγεται η υδρόλυση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και η ζύμωση των προϊόντων τους για την παραγωγή αιθανόλης [Lynd et al. 2005].

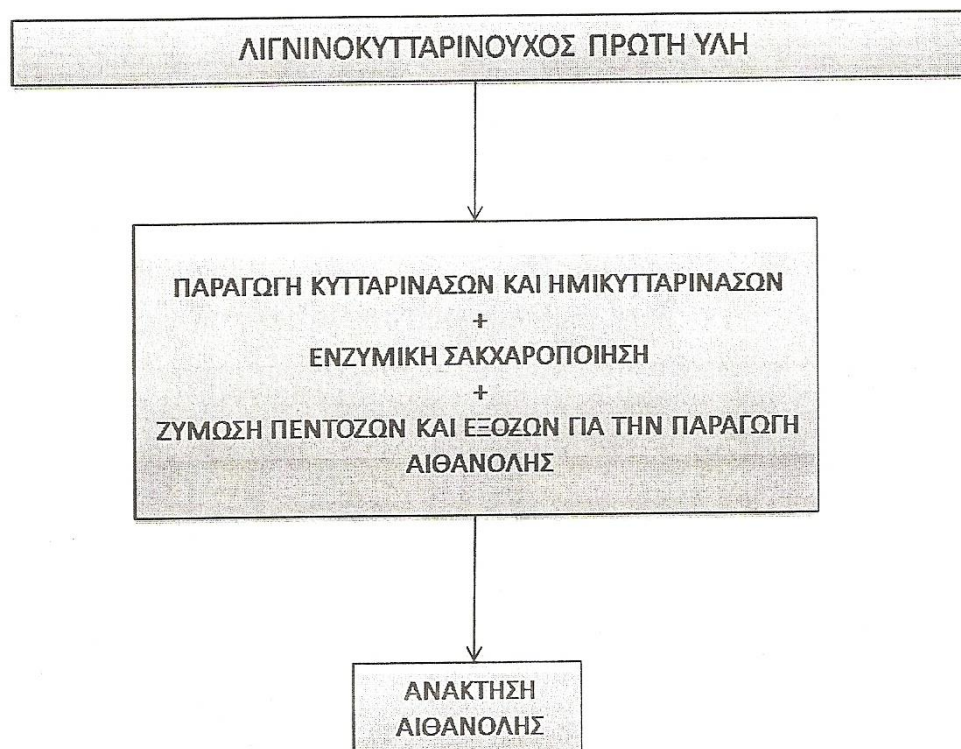


Συγκριτικά με την ξεχωριστή υδρόλυση και ζύμωση (SHF), η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- (1) αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης, λόγω μετατροπής των σακχάρων που παρεμποδίζουν την δράση των κυτταρινασών
- (2) μικρότερες απαιτήσεις σε ένζυμα
- (3) μεγαλύτερη παραγωγή προϊόντος
- (4) μείωση της χρονικής διάρκειας της διεργασίας
- (5) μικρότερος κίνδυνος μόλυνσης του μέσου καλλιέργειας από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς λόγω της παρουσίας της αιθανόλης
- (6) μείωση στο κόστος επένδυσης λόγω χρήσης μικρότερου αριθμού αντιδραστήρων [Zaldivar et al.2001, Sun and Cheng 2002, Szczodrak and Fiedurek 1995, Ballesteros et al.2004]. Ωστόσο, είναι απαραίτητος ένας συμβιβασμός όσον αφορά τη θερμοκρασία και το pH που θα διεξαχθεί η σακχαροποίηση και η ζύμωση της κυτταρίνης [Ballesteros et al. 2004].

Το κύριο μειονέκτημα της SSF είναι οι διάφορες μέγιστες θερμοκρασίες της υδρόλυσης και οι διαδικασίες των ζυμώσεων. Οι περισσότερες ζύμες έχουν τη βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας ανάμεσα στους 30°C με 35°C, ενώ τα ένζυμα έχουν την βέλτιστη δραστηριότητα τους περίπου στους 50°C.

### 1.7.3 Άμεση μικροβιακή μετατροπή (Direct Microbial Conversion, DMC ή Consolidated Bioprocessing, CBP )



*Εικόνα 6:* CBP (Χριστακόπουλος 2010)

Με τη μέθοδο αυτή, όλα τα απαραίτητα στάδια βιομετατροπής του κυτταρινούχου υλικού σε αιθανόλη, δηλαδή η παραγωγή των σακχαρολυτικών ενζύμων (κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες), η υδρόλυση του υποστρώματος σε απλούστερα σάκχαρα (πεντόζες και εξόζες) και η ζύμωση αυτών των σακχάρων σε αιθανόλη, πραγματοποιούνται σε ένα μόνο στάδιο.

Η βασική διαφορά της άμεσης μικροβιακής μετατροπής από τις προηγούμενες μεθόδους είναι η απουσία ξεχωριστού σταδίου για την παραγωγή σακχαρολυτικών ενζύμων, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την απαλοιφή του κόστους που σχετίζεται με αυτό το στάδιο. Σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους, ολόκληρη η ποσότητα της πρώτης ύλης είναι διαθέσιμη για την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων.

Υπάρχει ακόμα η δυνατότητα χρήσης κυτταρινασών με μεγάλη ειδική ενεργότητα και είναι εφικτή η συνέργια ενζύμου-29 μικροοργανισμού. Το αποτέλεσμα είναι η αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης και η περαιτέρω μείωση του κόστους επένδυσης λόγω μείωσης του όγκου του αντιδραστήρα. Επιπλέον, με τη μέθοδο αυτή μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, καθώς και βελτίωση της σταθερότητας των καλλιεργειών και των στελεχών που χρησιμοποιούνται [Lynd et al. 2002, Lynd et al.2005].

## 1.8 Διαδικασία Παραγωγής Αιθανόλης

Ένας σημαντικός παράγοντας που αποτρέπει την βιομηχανική χρήση των λιγνοκυτταρινούχων για την παραγωγή βιοαιθανόλης είναι η έλλειψη των μικροοργανισμών που είναι σε θέση να ζυμώσουν αποτελεσματικά (με υψηλή απόδοση και υψηλό ποσοστό) το σύνολο των σακχάρων (πεντόζες και εξοζες) που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της προεπεξεργασίας και της υδρόλυσης. Όσον αφορά την εμπορική παραγωγή αιθανόλης, ο ιδανικός μικροοργανισμός πρέπει να έχει ευρεία χρήση υποστρωμάτων, υψηλή απόδοση αιθανόλης, ανοχή του στους αναστολείς που υπάρχουν στο υδρολυμα, ανοχή στις υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και της κυτταρινολυτικής δραστηριότητας και τέλος να έχει την ικανότητα ζύμωσης της σακχάρων σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι πιο γνωστοί μικροοργανισμοί για τη παραγωγή αιθανόλης από εξοζες είναι ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* και το βακτήριο *Zymomonas mobilis* που προσφέρουν υψηλές αποδόσεις αιθανόλης (90 - 97% της θεωρητικής) και μεγάλη ανοχή σε αιθανόλη μέχρι το 10% (w / v) περιπου σε μια ζυμωση. Κύριο μειονέκτημα των γηγενών στελεχών του *S. cerevisiae* και *Z. mobilis* είναι η αδυναμία τους να ζυμώσουν την ξυλοζη, ζάχαρο που κυρίως προέρχεται από την ημικυτταρίνη. Άλλοι γνωστοί μικροοργανισμοί που μπορούν να ζυμώσουν τη ξυλόζη σε αιθανόλη, είναι τα εντερικά βακτηρία, οι ζυμες *stipitis Pichia*, *Candida shehatae*, και *Pachysolen tannophilus* που χαρακτηρίζονται όμως από χαμηλές αποδόσεις στη παραγωγή αιθανόλης. Για να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη του *S. cerevisiae* μπορούν να ζυμώσουν και τις εξοζες και τις πεντόζες που έχουν αναπτυχθεί. Ωστόσο, τα στελέχη έχουν δείξει χαμηλή παραγωγικότητα σε σχέση με τη μετατροπή της ξυλοζης σε αιθανόλη. Επιπλέον, υπάρχει ένα πρακτικό μειονέκτημα για την ευρεία εφαρμογή του ανασυνδυασμένου γένους της αιθανόλης, δεδομένου ότι τα πλασμίδια ξυλοζης με τα τροποποιημένα γονίδια συχνά απορρίπτονται από τον ξενιστή. (Panagiotou, G., Olsson, L., 2007)

Λαμβάνοντας υπόψη τα οφέλη από την διαδικασία της ζύμωσης σε υψηλες θερμοκρασίες συμπεριλαμβανομένων και υψηλών ρυθμών παραγωγής, όπου διευκολύνεται η ανάκτηση των προϊόντων τη χρήση ενός ευρέος φάσματος από υποστρώματα και το χαμηλό κίνδυνο μόλυνσης, η ζύμωση αιθανόλης με αναερόβια και θερμοφιλα βακτήρια, όπως *Clostridium sp.* και *Thermoanaerobacter sp.* φανεται να είναι η καλύτερη πρόταση. Το κύριο μειονέκτημα των θερμοφίλων αιθανολογενων είναι μικρή ανοχή τους σε αιθανόλη. Επιπλέον, πολλά από τα γένη της αιθανόλης παράγουν και άλλα προϊόντα όπως πτητικά λιπαρά οξέα και γαλακτικά οξέα, εκτός από αιθανόλη. (Irina Angelidaki (2009))

Η ζύμωση αιθανόλης του άχυρο σίτου που έχει υδρολυθεί ως πρώτη ύλη έχει μελετηθεί ευρέως με διαφορετικούς μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και τις ζύμες, τα βακτήρια και τους μύκητες, και συνήθως καλλιεργούνται σε αμιγείς καλλιέργειες (Πίνακας 4). Ο *P. stipitis*, της *Kluyveromyces marxianus*, μητρικά και ανασυνδυασμένα στελέχη *S. cerevisiae*, ήταν οι πιο ευρέως μελετημένες ζύμες για τη ζύμωση αιθανόλης με βάση το υδρολυμένο άχυρο σίτου ως πρώτη ύλη. Μέχρι στιγμής τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την απόδοση αιθανόλης, τη τελική συγκέντρωση της αιθανόλης και την ογκομετρική παραγωγή αιθανόλης πάρθηκαν με τους μητρικούς, μη-προσαρμοσμένους ζυμομύκητες (Πίνακας 4). Η παραγωγή της αιθανόλης με *Pichia sp.* έχει καταφέρει να φτάσει μέχρι 0,42 (g / g), ωστόσο η μέση ογκομετρική παραγωγή της αιθανόλης ήταν περίπου η μισή σε σχέση με ότι έχει καταγράψει με το *Kluyveromyces sp.* (Πίνακας 4). Κοινό πρόβλημα αποτέλεσε η προσέγγιση της υψηλής αποτελεσματικότητας της ζύμωσης (86% την απόδοση αιθανόλης), για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν έτσι δύο διαφορετικοί φυλογενετικά μικροοργανισμοί, όπως έδειξαν έρευνες το 1996. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε η υδρόλυση του άχυρο σίτου με απλά σάκχαρα χρησιμοποιώντας το μύκητα *Trichoderma viride* με αερόβια ανάπτυξη και ζύμωση με αποτέλεσμα τη μετατροπή ξυλόζης και γλυκόζης σε αιθανόλη από ζύμη *Pachysolen tannophilus*. Όσον αφορά τα θερμοφιλα, η αιθανόλη που παράχθηκε από θερμοαναερόβια ανάπτυξη με πρώτη ύλη το προεπεξεργασμένο άχυρο σίτου ήταν πολύ λιγότερη σε σύγκριση με εκείνη που παράχθηκε με ζυμομύκητες και μύκητες (Πίνακας 3). Προσφατα έχουν απομονωθεί αιθανολογενή που ανήκουν σε θερμοαναερόβια, που παράγουν κυρίως αιθανόλη από πεντόζες με απόδοση κοντα στο 70%. Τα μόνα

πρόσθετα προϊόντα εκτός της αιθανόλης ήταν οξικό οξύ και υδρογόνο. (Irimi Angelidaki (2009))

Πίνακας 4: Ιδιότητες ορισμένων μικροοργανισμών που παράγουν αιθανόλη που εμπλέκονται στην αιθανόλη ζύμωση των άχυρο σίτου που βασίζονται στις υδρόλυσεις.

Microorganism	Phylogeny	$Y_E^2$ (%)	$r_E$ (g/L.h)	$C_E$ (g/L)	Growth conditions	References
<i>S. cerevisiae</i> <sup>b</sup>	Yeast	99	1.16	31.2	Mesophilic, facultative anaerobic	Jorgensen (2009)
<i>Thermoanaerobacter BG111</i>	Bacteria	76	0.2	14.4	Extreme thermophilic (70 °C), strict anaerobic	Georgieva et al. (2008)
<i>Kluyveromyces marxianus CECT 10875</i>	Yeast	65	0.5	36.2	Thermotolerant (42 °C), facultative anaerobic	Tomas-Pejo et al. (2009)
<i>S. cerevisiae</i> strains CPB.CB4	Yeast (recombinant)	84	0.27	12.8	Mesophilic, facultative anaerobic	Otero et al. (2007)
<i>Hchia stipitidis</i>	Yeast	82	0.27	19	Mesophilic, facultative anaerobic	Nigam (2001)
<i>Trichoderma viride</i> + <i>Pachysolen tanphophylus</i>	Fungus				Mesophilic, aerobic fungus	Zayed and Meyer (1996)
	Yeast	86	0.25	11.8	Facultative anaerobic yeast	
<i>E. coli</i> strain FBR5	Bacteria (recombinant)	90	0.4	18.9	Mesophilic, semianaerobic	Saha and Cotta (2006)

Τα ανασυνδυασμένα βακτήρια που τους έχει γίνει αφαίρεση των γονιδίων που ευθύνονται για την παραγωγή παραπροϊόντων έχουν εξεταστεί παράλληλα για την παραγωγή αιθανόλης. Ένα ανασυνδυασμένο βακτήριο, όπως *E. coli* στέλεχος FBR5, που έχει ελεγχθεί για την παραγωγή αιθανόλης από προεπεξεργασμένα άχυρο σίτου και παρουσίασε την υψηλότερη απόδοση αιθανόλης με την διαδικασία της βιομετατροπής από πρώτες ύλες που προέρχονται από άχυρο σίτου (Πίνακας 4). Η συγκέντρωση της αιθανόλης και η ογκομετρική παραγωγικότητα που αναφέρθηκαν συγκρίθηκαν με τη συγκέντρωση αιθανόλης που λαμβάνονται με ζύμη *P. stipitidis* και τη παραγωγή της με ζύμη *K. marxianus* (Πίνακας 3). Οι ερευνητικές προσπάθειες που αφορούν τη ζύμωση αιθανόλης εξακολουθούν να βρίσκονται σε εξέλιξη. Η εύρεση νέων μη επεξεργασμένων τύπων γενών αιθανόλης ή η κατασκευή νέων και πολλά υποσχόμενων γενετικά ελεγχόμενων οργανισμών (GMO) με μεγαλύτερη ανοχή στην αιθανόλη, στην παραγωγικότητα και στην απόδοση θα δημιουργήσει τη βάση για την μελλοντική ανάπτυξη από εμπορική χρήσης λιγνίνης ως βάση για την παραγωγή βιοαιθανόλης από άχυρο σίτου. (Irimi Angelidaki (2009))

## 1.9 Ο Μύκητας *Fusarium oxysporum*

Το φυσικό στέλεχος *F3* του μύκητα *Fusarium oxysporum* μπορεί να μετατρέψει αποτελεσματικά κυτταρινούχα και ημικυτταρινούχα παραπροϊόντα σε αιθανόλη, στα πλαίσια μίας ενοποιημένης διεργασίας βιομετατροπής (consolidated bioprocessing). (Xiros 2009)



Εικόνα 7: *Fusarium oxysporum*

Η ταξινόμηση των μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Fusarium* είναι η εξής: *Eukaryota* (Υπερβασίλειο), *Fungi* (Βασίλειο), *Ascomycota* (Φύλο), *Pezizomycotina* (Υποφύλο), *Sordariomycetes* (Κλάση), *Hypocreomycetidae* (Υποκλάση), *Hypocreales* (Τάξη), *Fusarium* (Γένος), *Fusarium oxysporum* (Είδος) [NCBI].

Το στέλεχος *F3* του *Fusarium oxysporum*, έχει απομονωθεί από το κύμινο. Παράγει ένα ευρύ φάσμα κυτταρινασών και ημικυτταρινασών σε βυθισμένη ζύμωση, χρησιμοποιώντας σαν πηγή άνθρακα διάφορα λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Το στέλεχος αυτό έχει την εξαιρετική ιδιότητα να μετατρέπει κατευθείαν την κυτταρίνη και τη ξυλάνη σε αιθανόλη. Συνεπώς, αν χρησιμοποιηθεί ο *F. oxysporum* για την παραγωγή

αιθανόλης από βιομάζα, δεν είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ξεχωριστή ενζυμική υδρόλυση της λιγνοκυτταρινούχου πρώτης ύλης, αφού ο μύκητας αυτός μπορεί να παράγει όλα τα αναγκαία ένζυμα [Panagiotou et al. 2005δ, Panagiotou et al. 2005γ, Panagiotou et al.2003].

Διάφοροι φυσικοί παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και οι συνθήκες αερισμού επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή αιθανόλης από τον *Fusarium oxysporum*. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης έχει πραγματοποιηθεί σε τιμές pH 5.5 και 6, για αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες καλλιέργειας αντίστοιχα. Το pH για την αναερόβια καλλιέργεια, είναι επίσης βέλτιστο για την ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης, που έχει βρεθεί ότι είναι το ένζυμο κλειδί για την άμεση μετατροπή της κυτταρίνης από το *F.oxysporum* F3 (αναστέλλει την παρεμπόδιση από την κελλοβιόζη). Η επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή αιθανόλης εξαρτάται από το στέλεχος που χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα, για το στέλεχος F3, έχει βρεθεί ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή ενζύμων είναι 30°C και για την παραγωγή αιθανόλης με υπόστρωμα κυτταρίνη υπό αναερόβιες συνθήκες είναι 34°C. Οι συνθήκες αερισμού παίζουν επίσης πολύ σημαντικό ρόλο. Επειδή οι μύκητες δεν αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες και η αιθανόλη δεν παράγεται υπό αερόβιες συνθήκες, συνήθως αναπτύσσεται πρώτα ο μικροοργανισμός αερόβια και στη συνέχεια, τα μυκήλια τοποθετούνται σε ημιαναερόβιες συνθήκες για την παραγωγή αιθανόλης [Singh and Kumar 1991, Christakopoulos et al.1989]. 42

Μειονεκτήματα της χρήσης του *F.oxysporum* στην παραγωγή αιθανόλης είναι ο χαμηλός ρυθμός μετατροπής της κυτταρίνης, καθώς και ο σχηματισμός σημαντικών ποσοτήτων οξικού οξέος σαν παραπροϊόν [Panagiotou et al. 2005δ, Panagiotou and Christakopoulos 2004].



## Κεφάλαιο 2: Άχυρο Σίτου

### 2.1 Εισαγωγή :

Το **σιτάρι** ή **στάρι** ή **σίτος** (*Triticum* spp), είναι ένα φυτό που καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο. Είναι το δεύτερο παγκοσμίως σε συγκομιδή δημητριακό, μετά τον αραβόσιτο, με τρίτο το ρύζι. Ο καρπός του σίτου είναι μια βασική τροφή, που χρησιμοποιείται στην Παρασκευή αλευριού, ζωοτροφών και ως πρώτη ύλη στην παρασκευή αλκοολούχων ποτών και καυσίμων. Ο φλοιός του μπορεί να αποσπαστεί από τον καρπό και να αλεστεί, δίνοντας το λεγόμενο πίτουρο. Ο σίτος καλλιεργείται επίσης για τη βοσκή των ζώων, καθώς και για το άχυρο, τον κορμό του φυτού, που χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή ή υλικό κατασκευών. Το σιτάρι, όπως και τα άλλα δημητριακά, η βρώμη, η σίκαλη, το κριθάρι, περιέχουν μία πρωτεΐνη, τη γλουτένη, στην οποία πολλοί άνθρωποι είναι αλλεργικοί. Το σιτάρι (*Triticum aestivum* L.) είναι η πιο ευρέως αναπτυσσόμενη καλλιέργεια, που παράγεται σε πάνω από 115 έθνη κάτω από ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Κατά τα τελευταία 100 χρόνια, οι αποδόσεις του σιταριού έχουν αυξηθεί και η ετήσια παγκόσμια παραγωγή σιταριού το 2008 εκτιμήθηκε σε πάνω από 650 Tg. Υποθέτοντας ότι το υπόλειμμα / καλλιέργεια ετησίως παράγεται σε ποσοστό 1,3 περίπου για 850 Tg καταλοίπων σίτου [Καραμάνος 1992],[Σφήκας 1995].



**Εικόνα 8:**

Η παγκόσμια μέση απόδοση του σίτου είναι περίπου  $2,4 \text{ Mg ha}^{-1}$  και ως εκ τούτου, περίπου 430 Tg από άχυρο σίτου ετησίως είναι διαθέσιμα για παραγωγή περίπου 120 GL βιοαιθανόλης. Αυτός ο όγκος της αιθανόλης μπορεί να αντικαταστήσει περίπου  $93 (\pm 3)$  GL της βενζίνης, όταν λαμβάνονται υπόψη οι διαφορές τους σε ογκομετρικό ενεργειακό περιεχόμενο και ο αριθμός οκτανίων [Otero, J., Panagiotou, G., Olsson, L., 2007]. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι κάτω από σωστή μικρορύθμιση των παραμέτρων του κινητήρα, τα μίγματα αιθανόλης-βενζίνης θα οδηγήσουν σε βελτιωμένη απόδοση του κινητήρα και

σε μείωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα . Έτσι, η μετατροπή από την καύση του άχυρο σίτου σε αιθανόλη λόγω πλεονάσματος άχυρου σίτου φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την απόκτηση ενέργειας από υπολείμματα βιομάζας και εν μέρει μειώνει την εξάρτηση από ορυκτά καύσιμα, ενώ παράλληλα συμβάλλει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου και τη βελτίωση της ποιότητας των αερίων της ατμόσφαιρας.

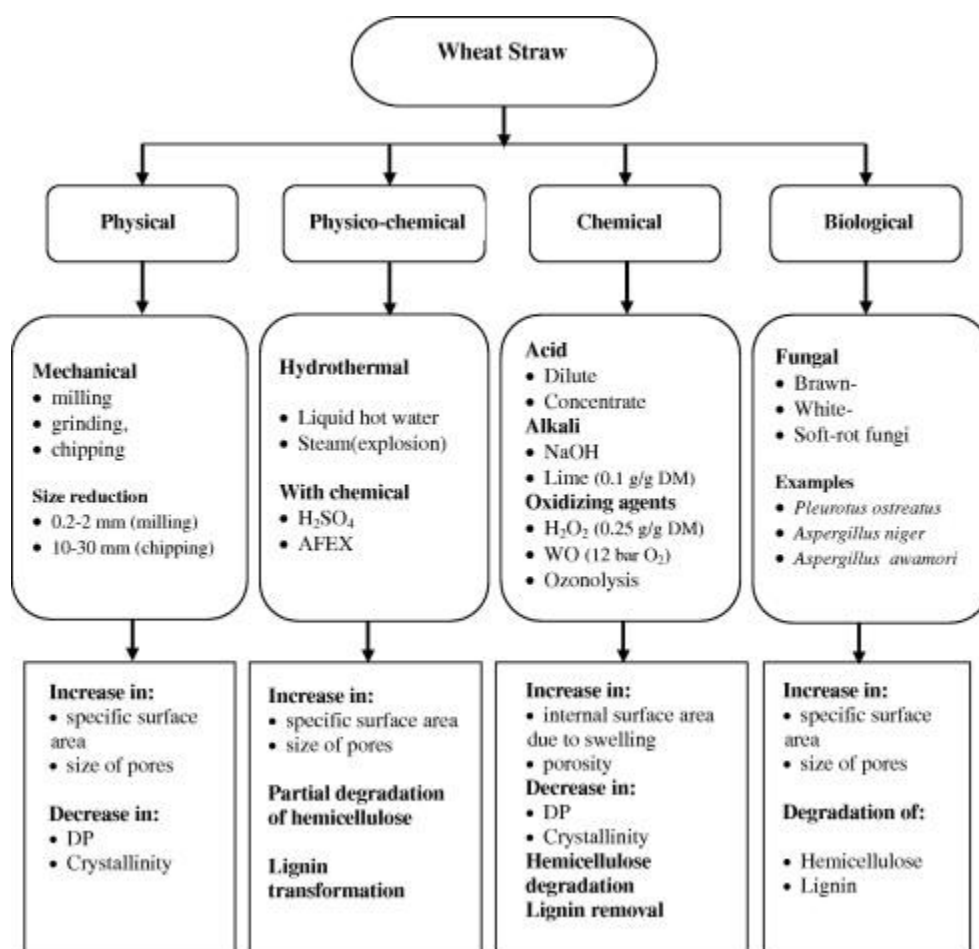
## 2.2 Το άχυρο σιταριού ως πιθανή πρώτη ύλη για 2<sup>ης</sup> γενιάς βιοκαύσιμα

Το άχυρο σίτου, όπως οποιαδήποτε άλλη βιομάζα λιγνοκυτταρινούχας σύνθεσης είναι ένα πολύπλοκο μίγμα από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη, σαν τρία βασικά συστατικά μιας μικρής ποσότητας από διαλυτά υποστρώματα (γνωστά ως εκχυλίσματα) και τέφρα. Η συνολική χημική σύνθεση του σιταριού διαφέρει ελαφρώς ανάλογα με είδος του σιταριού, το έδαφος, και τις κλιματικές συνθήκες που καλλιεργείται . Το περιεχόμενο της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης στο άχυρο σίτου είναι της τάξης του 33-40, 20-25, και 15-20 (% w / w) αντίστοιχα [Prasad, S., Singh, A., Joshi, H.C., 2007]. Τα στελέχη της κυτταρίνης ομαδοποιούνται και συνδέονται 'σφικτά' με τέτοιο τρόπο ώστε ούτε νερό ούτε ένζυμο να διεισδύσει μέσα στη δομή [50]. Η ημικυτταρίνη εξυπηρετεί στη σύνδεση μεταξύ λιγνίνης και ινών κυτταρίνης και εύκολα υδρολύεται από αραιό οξύ ή βάση και ένζυμα. Η λιγνίνη ομοιοπολικά συνδέεται με την κυτταρίνη και την ξυλάνη (κυρίαρχο πολυμερές υδατανθράκων στο άχυρο σίτου), έτσι ώστε οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιγνίνης- κυτταρίνης- εξάνης να ασκούν μεγάλη επιρροή στην πεπτικότητα των λιγνοκυτταρινούχων υλικών . Λόγω αυτής της πολυπλοκότητας της δομής των λιγνοκυτταρινούχων , η παραγωγή αιθανόλης από άχυρο σίτου απαιτεί τουλάχιστον τέσσερις φάσεις επεξεργασίας :

- ✓ την προεπεξεργασία,
- ✓ την υδρόλυση,
- ✓ την ζύμωση,
- ✓ την απόσταξη

Σε αντίθεση με την σακχαρόζη ή το άμυλο, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα όπως το άχυρο σίτου πρέπει να είναι προεπεξεργασμένη για να «γίνει προσβάσιμη» η κυτταρίνη για τον αποτελεσματικό ενζυμικό αποπολυμερισμό.

## 2.3 Προεπεξεργασία αχύρου σιταριού



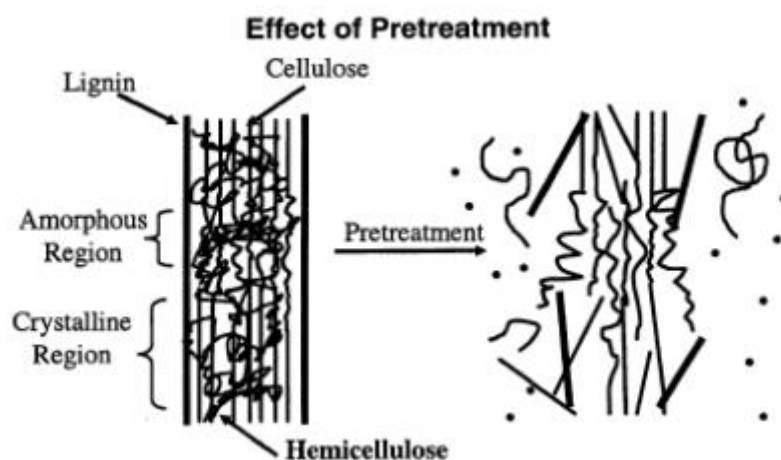
Πίνακας (4): Κοινές μέθοδοι προεπεξεργασίας αχύρου σίτου (PWS)

### 2.3.1 Στόχοι της προεπεξεργασίας του αχύρου σίτου

Η προεπεξεργασία είναι μια σημαντική διαδικασία για βιοχημική μετατροπή λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας σε πχ. Αιθανόλη. Απαιτείται για να αλλάξει την δομή της κυτταρινούχας βιομάζας προκειμένου να κάνει την κυτταρίνη πιο προσιτή στα ένζυμα, τα οποία μετατρέπουν τα πολυμερή των υδρογονανθράκων σε σάκχαρα προκειμένου να υποστούν ζύμωση. Η προκατεργασία αποτελεί μια από τις πιο ακριβές διεργασίες στην μετατροπή της κυτταρινούχας βιομάζας σε σάκχαρα. [Alvira, P., E. Tomas-Pejo, et al. (2009)]

Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες μέθοδοι προεπεξεργασίας με σκοπό να αυξήσουν την δραστικότητα της κυτταρίνης και την απόδοση των σακχάρων που πρόκειται να ζυμωθούν. Οι τυπικοί στόχοι της προκατεργασίας συμπεριλαμβάνουν:

- 1) Την παραγωγή υψηλής πεπτικότητας υποστρωμάτων, ώστε να εμπλουτίσουν την απόδοση των σακχάρων κατά την ενζυμική υδρόλυση. Αυτό επιτυγχάνεται με αύξηση της επιφάνειας επαφής και του πορώδους.
- 2) Αποφυγή της υποβάθμισης των σακχάρων (κυρίως των πεντοζών) συμπεριλαμβανομένων και αυτών που προέρχονται από την ημικυτταρίνη.
- 3) Ελαχιστοποίηση της παραγωγής τοξικών ουσιών που λειτουργούν ως παρεμποδιστές σε μεταγενέστερα στάδια της ζύμωσης.
- 4) Ανάκτηση της λιγνίνης για μετατροπή της σε χρήσιμα παραπροϊόντα.
- 5) Μείωση της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης
- 6) Χαμηλή κατανάλωση ενέργειας έτσι ώστε να είναι οικονομικά εφικτή και να μπορεί να πραγματοποιείται σε αντιδραστήρες συμβατού μεγέθους.



**Εικόνα 9** Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της προεπεξεργασίας στην λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα [Hsu, T. A., M. R. Ladisch, et al. (1980)]

Οι προ-επεξεργασίες κατατάσσονται κατά προσέγγιση σε φυσικές, φυσικοχημικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες.

### 2.3.2 Φυσική Επεξεργασία

Το πρώτο βήμα για τη χρήση του άχυρου σίτου στην παραγωγή αιθανόλης είναι η μείωση του μεγέθους του μέσω του αλέσματος ή του ξεφλουδίσματος βελτιώνεται έτσι η αποτελεσματικότητα της μεταγενέστερης επεξεργασίας. Ωστόσο, η χρήση πολύ μικρών σωματιδίων μπορεί να μην είναι επιθυμητή λόγω της υψηλής κατανάλωσης σε ενέργειας στο στάδιο άλεσης, καθώς υπάρχουν και αρνητικές επιδράσεις στην ακόλουθη μέθοδο προκατεργασίας. Το αρχικό και τελικό μέγεθος των σωματιδίων, η υγρασία και ιδιότητες υλικών είναι μεταξύ των μεταβλητών που επηρεάζουν τόσο την ενεργειακή κατανάλωση αλλά και την αποτελεσματικότητα της μετέπειτα επεξεργασίας. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων και τόσο υψηλότερη είναι η υγρασία και η περιεκτικότητα σε άχυρο τόσο υψηλότερη είναι και η κατανάλωση ενέργειας. Η μείωση του μεγέθους έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την ευαισθησία των ακατέργαστων υποστρωμάτων στην ενζυμική

υδρόλυση. Η απελευθέρωση της γλυκόζης και της ξυλόζης από τα μικρότερα τεμάχια του άχυρου μπορούν να αυξηθούν μέχρι και 39% των θεωρητικών μέγιστων τιμών μετά από 24 ώρες υδρολύσεως σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς. Η υγρή στη οξείδωση έδειξε την εντονότερη επίδραση στα μεγαλύτερα σωματίδια από στα μικρότερα σωματίδια.

### **2.3.3 Φυσικοχημική Επεξεργασία**

Η διαλυτοποίηση των συστατικών της λιγνοκυτταρίνης εξαρτάται από την θερμοκρασία, το pH και την υγρασία. Σε λιγνοκυτταρινούχα υλικά όπως το άχυρο σίτου, η ημικυτταρίνη είναι το πιο θερμικά και χημικά ευαίσθητο κλάσμα. Ενώσεις όπως η ημικυτταρίνη αρχίζουν να διαλύονται στο νερό με θερμοκρασία μεγαλύτερη από 150 βαθμών κελσίου και με τη βοήθεια διαφόρων εξαρτημάτων, σε αντίθεση με τη ξυλάνη που μπορεί να εξαχθεί το πιο εύκολα. Άλλες φ/χ μέθοδοι είναι:

#### **2.3.3.1 Έκρηξη Ατμού**

Η έκρηξη ατμού (autohydrolysis) είναι μία από τις πιο αποδοτικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους προκατεργασίας για το άχυρο σίτου. Σε αυτή τη μέθοδο, μειώνεται το μέγεθος της βιομάζα θερμαίνοντας γρήγορα με ατμό υψηλής πίεσης για ένα χρονικό διάστημα και στη συνέχεια μειώνεται η πίεση ξαφνικά με αποτέλεσμα τα υλικά να υποβάλλονται στη διαδικασία “εκρηκτικής” αποσυμπίεση. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται είναι στην περιοχή των 160 - 230 °C για μία χρονική περίοδο από αρκετά δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά. Η αποτελεσματικότητα της έκρηξης ατμού επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της θερμοκρασίας, το χρόνο παραμονής, το μέγεθος των σωματιδίων και της περιεκτικότητας τους σε υγρασία. Η προσθήκη χημικών ουσιών, όπως H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ή SO<sub>2</sub> μπορεί να βελτιώσει το ποσοστό και το ρυθμό της απομάκρυνσης ημικυτταρίνης και να οδηγήσει σε μεγαλύτερη απόδοση της ενζυματικής υδρόλυσης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. (Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irini Angelidaki (2009)

#### **2.3.3.2 Έκρηξη Αμμωνιακών Ιόντων**

Η έκρηξη των αμμωνιακών ιόντων (AFEX) είναι μια αλκαλική θερμική μέθοδος προεπεξεργασίας κατά την οποία τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά εκτίθενται σε υγρή

αμμωνία σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και ακολουθείται μία ταχεία εκτόνωση. Τα ποώδη φυτά και τα γεωργικά υπολείμματα είναι κατάλληλα για τη προεπεξεργασία AFEX. Η μέθοδος αυτή δεν παράγει αναστολές και το μικρό μέγεθος των σωματιδίων δεν είναι απαραίτητο για την αποτελεσματικότητα της. Οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν την AFEX είναι η διαδικασία φόρτωσης της αμμωνίας, η θερμοκρασία, η πίεσης απαέρωσης, η περιεκτικότητα σε υγρασία της βιομάζας και ο χρόνος παραμονής. Αυτή η προκατεργασία έχει σαν μειονεκτήματα τη μικρή απόδοση για βιομάζα που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις λιγνίνης (π.χ. μαλακό ξύλο εφημερίδα) καθώς και η διαλυτοποίηση του στερεού υλικού ιδιαίτερα ημικυτταρίνης σε πολύ μικρά κλάσματα. (Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irini Angelidaki (2009)

### 2.3.3.3 Οξίνη Υδρολύση

Ανόργανα οξέα όπως το  $H_2SO_4$  έχουν χρησιμοποιηθεί για την προεπεξεργασία του άχυρου σίτου για τη βελτίωση της μεταγενέστερης ενζυματικής υδρόλυσης. Ανάλογα με τη πυκνότητα του οξέος που χρησιμοποιείται στη διαδικασία, θα μπορούσαμε να τις διαχωρίσουμε σε πυκνή και σε αραιή όξινη υδρόλυση. Στην πρώτη την περίπτωση, η βιομάζα κατεργάζεται σε υψηλή συγκέντρωση των οξέων σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, γεγονός που οδηγεί σε υψηλή απόδοση των σακχάρων. Η συμπυκνωμένη όξινη κατεργασία παρέχει το πλεονέκτημα ότι δε χρησιμοποιεί κανένα ένζυμο για τη σακχαροποίηση, ωστόσο, αυτή η μέθοδος έχει αρκετά μειονεκτήματα όπως η υψηλή οξύτητα, η κατανάλωση ενέργειας, η διάβρωση του εξοπλισμού, ο χρόνος αντίδρασης και η αναγκαστική ανάκτηση οξέος μετά τη θεραπεία. Όλα αυτά περιορίζουν σε μεγάλο βαθμό την εφαρμογή της. Στη δεύτερη μέθοδο η κατεργασία γίνεται με χαμηλής συγκέντρωσης οξέα π.χ. 0,5-1%  $H_2SO_4$  και σε υψηλές θερμοκρασίες. Η υψηλή θερμοκρασία είναι ευνοϊκή για την επίτευξη αποδεκτών ρυθμών μετατροπής της κυτταρίνης σε γλυκόζη. (Galbe and Zacchi, 2002).

### 2.3.4 Χημική Επεξεργασία

Η χημική προεπεξεργασία του άχυρου σίτου χρησιμοποιεί διάφορες χημικές ουσίες όπως οξέα, αλκάλια και οξειδωτικά π.χ. υπεροξείδιο και όζον . Μεταξύ αυτών των μεθόδων, η αραιή όξινη προεπεξεργασία χρησιμοποιεί  $H_2SO_4$  και είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Ανάλογα με το είδος των χρησιμοποιούμενων χημικών, η προεπεξεργασία θα μπορούσε να έχει διαφορετικά αποτελέσματα στα δομικά στοιχεία λιγνίνης. Η αλκαλική προεπεξεργασία, η οζονόλυση, το υπεροξείδιο και η υγρή οξειδωτική προεπεξεργασία είναι περισσότερο αποτελεσματικές στην αφαίρεση λιγνίνης, ενώ η αραιή όξινη προεπεξεργασία είναι πιο αποτελεσματική στην διαλυτοποίηση ημικυτταρίνης [Galbe, M., Zacchi, G., 2002].

Ιδιαίτερη κατηγορία προεπεξεργασίας άχυρου σίτου αποτελεί η **βιολογική προεπεξεργασία**.

#### 2.3.4.1 Οξειδωτικοί Παράγοντες

Αλκαλική / οξειδωτική προεπεξεργασία. Σε αυτή τη προκατεργασία, η οξειδωτική ένωση όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) ή το υπεροξικό οξύ ( $C_2H_4O_3$ ) χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μια αλκαλική ένωση (π.χ.  $NaOH$ ) υπό ήπια θερμοκρασία. Αυτή η διεργασία είναι πιο αποτελεσματική στη βελτίωση της χώνευσης υπολειμμάτων καλλιέργειών σε σύγκριση με τη θεραπεία μόνο με  $NaOH$ . (Garcia-Cubero et al., 2009).

#### 2.3.4.2 Υγρή Οξείδωση (WO)

Στην υγρή οξείδωση, η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα υποβάλλεται σε επεξεργασία με νερό και οξυγόνο υψηλής πίεσεως ή αέρα σε υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από  $120^\circ C$ ). Η πίεση του οξυγόνου είναι μεταξύ 120-480 Psi. Η WO είναι μία αποτελεσματική μέθοδος προκατεργασίας για την κλασματοποίηση του άχυρου σιταριού σε διαλυτοποιημένα κλάσματα ημικυτταρίνης και ένα πλούσιο στερεό κλάσμα σε κυτταρίνη με υψηλή ευαισθησία στην ενζυματική υδρόλυση. Ο συνδυασμός της αλκαλικής και WO όχι μόνο βελτιώνει το ρυθμό της οξείδωσης της λιγνίνης (και με τη σειρά της ενζυματικής υδρόλυσης), αλλά αποτρέπει επίσης το σχηματισμό της φουρφουράλης και HMF. Τα οξέα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αρχικής αντίδρασης στη WO λόγω της διαλυτοποίησης των ημικυτταρίνικων συστατικών καταλύουν τις επόμενες υδρολυτικές αντιδράσεις μέσω των οποίων οι ημικυτταρίνες διασπώνται σε θραύσματα χαμηλότερου μοριακού βάρους που είναι διαλυτα στο νερό..(Klinke et al., 2002).

### 2.3.5 Βιολογική Επεξεργασία

Η βιολογική προεπεξεργασία αποτελείται από τη χρήση μικροοργανισμών όπως οι μύκητες για επιλεκτική υποβάθμιση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης. Η υποβάθμιση της λιγνίνης συμβαίνει μέσω της δράσης των αντίστοιχων ενζύμων, όπως υπεροξειδάσες και λακάσες . Οι κατάλληλοι μύκητες για τη βιολογική προεπεξεργασία θα πρέπει να έχουν άμεση σχέση με τη λιγνίνη και να την υποβαθμίζουν πιο γρήγορα από ό, τι τα συστατικά υδατανθράκων. Η βιολογική προεπεξεργασία είναι ασφαλής και φιλική προς το περιβάλλον σε σύγκριση με άλλες μεθόδους προεπεξεργασίας. Ωστόσο, η ταχύτητα της αντίδρασης υδρόλυσης είναι πολύ χαμηλή και χρειάζεται μια μεγάλη βελτίωση για να είναι εμπορικά εφαρμόσιμη. Ο Hatakka (1983) διερεύνησε την προεπεξεργασία του άχυρου σίτου με 19 μύκητες και διαπίστωσε ότι το 35% του άχυρο σίτου μετατράπηκε σε αναγωγικά σάκχαρα μετά από πέντε εβδομάδες προκατεργασίας με *Pleurotus ostreatus* (σε σύγκριση με το μόλις 12% της μετατροπής μη επεξεργασμένου άχυρο).



## **Πειραματικό μέρος**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 :Υλικά και Μέθοδοι

### 3.1 Πηγές άνθρακα - Πρώτες Ύλες

#### 3.1.1 Το άχυρο σίτου (*Triticum aestivum* L.)

A) Το προκατεργασμένο άχυρο σίτου (PWS) προέρχεται από το πανεπιστήμιο της Κοπεγχάγης. Η προκατεργασία έγινε στις πιλοτικές εγκαταστάσεις της IBUS στη Δανία (Thomsen et al. 2006). Τα υλικά διατηρήθηκαν στους -18 °C. Πριν τη χρήση του υλικού έγινε ξήρανση στους 65 °C μέχρι σταθερού βάρους και τεμαχίστηκε σε κομμάτια μικρότερα των 3mm. Το προεπεξεργασμένο άχυρο συλλέχθηκε σε μεγάλες πλαστικές σακούλες, το βάρος του ήταν 30-50Kg και φυλάχθηκε στους 4 °C για 1-5 μήνες πριν χρησιμοποιηθεί. Το προεπεξεργασμένο άχυρο χρησιμοποιήθηκε για την ενζυματική υγροποίηση, τη σακχαροποίηση, και τη ζύμωση [Henning Jørgensen, et al., 2006] .

B) Σπάδικα αραβοσίτου (CC) , από γεωπονικό πανεπιστήμιο . Υπόλειμμα βύνης ( BG) , από αθηναϊκή ζυθοποιία

#### 3.1.2 Χημικά και διαλύματα

Όλα τα χημικά είναι προϊόντα της εταιρίας Sigma-Aldrich (USA).

#### 3.1.3 Μικροοργανισμοί

Ο μύκητας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο *F. oxysporum* F3, που απομονώθηκε από κύμινο (Christakopoulos et al., 1989). Ο μύκητας αναπτύχθηκε σε potato-dextrose-agar PDA σε θερμοκρασία 30 °C για 5 ημέρες. Μετέπειτα διατηρήθηκε στους 4 °C.

### **3.1.4 Αποστείρωση**

Η διαδικασία της αποστείρωσης πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (SANYO Labo Autoclave). Για την αποστείρωση σακχάρων οι συνθήκες διεξαγωγής της ήταν 110 °C και 40 min, ενώ για την αποστείρωση άχυρου οι συνθήκες ήταν 121°C για 20 min.

### **3.1.5 Εμβόλιο βιοαντιδραστήρα**

Για τον εμβολιασμό του βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες 250 ml, οι οποίες είχαν αποστειρωθεί στους 110°C για 40 λεπτά. Οι φιάλες περιείχαν τα παρακάτω μεταλλικά άλατα: 1.00 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.30 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.30 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10.0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 6.94 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και 9.52 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  καθώς επίσης και 20 g/L σπάδικα αραβοσίτου και 20 g/L υπόλειμμα βύνης. Ένα διάλυμα 15 mL απιονισμένου νερού που περιείχε 100  $\mu\text{L}$  TWEEN 80 προστέθηκε στο σωλήνα με τον αποθηκευμένο μικροοργανισμό και όγκος 5 mL από αυτό μεταφέρθηκε σε κάθε κωνική φιάλη. Τέλος, ο επωασμός της προκαλλιέργειας έγινε σε θερμοκρασία 30°C για 3 ημέρες στις 250 στροφές ανά λεπτό σε περιστροφικό αναδευτήρα .

### 3.2 Βιοαντιδραστήρας

Για την παραγωγή των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε κυλινδρικός αντιδραστήρας 20 λίτρων της εταιρίας MBR (εικόνα 10). Ο λειτουργικός όγκος του βιοαντιδραστήρα ήταν 16 L. Η ταχύτητα ανάδευσης ρυθμιζόταν ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος. Η παροχή αέρα στον αντιδραστήρα προσαρμοζόταν έτσι ώστε το διαλυμένο οξυγόνο της καλλιέργειας να είναι πάντα σε τιμές μεγαλύτερες του 20%. Η μέτρηση του οξυγόνου γίνεται με ηλεκτρόδιο οξυγόνου Ingold O<sub>2</sub> (Ingold, Steinbach, Germany). Οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν: T=30°C, pH=5 και RPM=200 σε αερόβιο περιβάλλον

Το μέσο της καλλιέργειας αποστειρώνεται *in situ* για 40 λεπτά στους 120 °C. Αυτό αποτελείται από υπόλειμμα βύνης και σπάδικα αραβοσίτου (40g/L) σε αναλογία 2-1. Περιέχει επίσης και τα μεταλλικά άλατα που προαναφέραμε.

Μετά το πέρας της ανάπτυξης η καλλιέργεια συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 14,000 στροφές ανά λεπτό (4 °C) για 20 λεπτά. Τελικά το υπερκείμενο υγρό συμπυκνώθηκε σε συσκευή Amicon με μεμβράνη υπερδιήθησης 10,000. Το τελικό συμπύκνωμα διατηρήθηκε στους -18 °C και χρησιμοποιήθηκε στις υδρολύσεις.



**Εικόνα 10:** Βιοαντιδραστήρας MBR 20L

### 3.3 Παραλαβή κυττάρων

Κατά τη διαδικασία της παραλαβής κυττάρων, γίνεται ανάπτυξη του *Fusarium oxysporum* σε γλυκόζη (40g/Lt). Οι φιάλες περιείχαν τα παρακάτω μεταλλικά άλατα, για την βέλτιστη ανάπτυξη του μύκητα :

1.00 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,

0.30 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.30 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

10.0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

6.94 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

9.52 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό αναδευτήρα (200 rpm), σε θερμοκρασία 30 °C για 4 ημέρες. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρωση στις 10000rpm. Παρελήφθησαν κύτταρα στη μορφή πολτού σε ποσοστό 15% cell/matter.

### 3.4 Ενζυμικά συστήματα

#### 3.4.1 Ενζυμα *Fusarium oxysporum*

Το στάδιο της παραγωγής του ενζύμου διεξάγεται σε βιοαντιδραστήρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται είναι μίγμα της BG και CC σε αναλογία 2/1. Στο τελικό στάδιο παραγωγής του ενζύμου το υπερκείμενο της καλλιέργειας φυγοκεντρείται (14000 rpm, 4C, 20 min) και το υπερκείμενο συμπυκνώνεται με τη χρήση υπέρ μεμβρανών διήθησης.

Η δραστηριότητα της ενδογλυκανάσης αυξήθηκε σημαντικά μετά από 45h καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα και έφτασε τα μέγιστα επίπεδα σε 108h (5,7 U / mL). Οι άλλες δραστηριότητες κυτταρινολυτικών επιτυγχάνονται μέγιστες τιμές μετά από 70h καλλιέργειας (0,85, 0,77 and 0,35 U / mL για FPA, β-Γλυκοσιδάση και κελλοβιοϋδρολάσης αντίστοιχα). Το υπερκείμενο της καλλιέργειας χρησιμοποιείται ως πηγή ενζύμων σε υδρολυτικές αντιδράσεις. Το κυτταρινολυτικό προφίλ δραστηριότητες του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος ήταν για 1FPU:12,5U ενδογλυκανάσης, 1,5 U κελλοβιοϋδρολάσης, 2,5 U β-Γλυκοσιδάση. Αυτό το ενζυματικό προφίλ είναι παρόμοιο με το προφίλ του κυτταρινολυτικού και ευρέως χρησιμοποιούμενου μίγματος των εμπορικών παρασκευασμάτων Celluclast 1,5 L και Novozyme 188 (Novozymes) σε αναλογία 5:1, με την εξαίρεση της δραστηριότητας β-Γλυκοσιδάση που στην παρούσα περίπτωση είναι περίπου δύο ή τρεις φορές υψηλότερη.

### **3.4.2 Celluclast - Novozyme**

Τα εμπορικά ενζύμα προέρχονται από την εταιρία Novozymes (USA).

### **3.4.3 Thermomix**

Το ενζυμικό αυτό σύστημα σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε από το Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο του Ελσίνκι (VTT). Το συστημά αυτό περιέχει ενεργότητες ενζύμων At CBHI/Cel7A ,Ct CBHII/Cel6A, Ta EGII/Cel5A και Ta XYL/Xyn10A σε αναλογίες 3.6:1.2:1.2:1 με επιπρόσθετη β-γλυκοζιδάση At Bg/Cel3A σε συγκέντρωση 1 mg/g στερεών (ΞΜ). Η τελική ενεργότητα του ενζύμου είναι 135 FPU/ml.

### 3.5 Μετρήσεις ενζυμικών ενεργοτήτων

#### 3.5.1 Κυτταρινάσες (Filter paper activity)

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των κυτταρινασών χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα διηθητικό χαρτί Watman No 1 (50 mg)(6cm\*1cm). Το αντιδρών μίγμα περιείχε το διηθητικό χαρτί, 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος pH=6 και 500 μl ενζυμικού διαλύματος. Επώαστηκε στους 50 °C σε θερμαινόμενο αναδευτήρα Eppendorf (1300 rpm) για 60min.

Ο υπολογισμός της απελευθερούμενης γλυκόζης έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Ως 1 Unit κυτταρινασών ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmole γλυκόζης ανά min, στους 50 °C, σε pH 6.

Σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος, σε 250 μl δείγματος προστίθενται 250 μl διαλύματος DNS. Πραγματοποιείται βρασμός για 5min. Ακολουθεί προσθήκη 2 ml απιονισμένου νερού και φωτομέτρηση στα 540nm [Miller 1959].

#### 3.5.2 Ενδογλυκανάσες

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενδογλυκανασών χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα καρβοξυ-μεθυλ-κυτταρίνη (Sigma, low viscosity), συγκέντρωσης 4% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος – όξινου φωσφορικού νατρίου 100 mM, pH 5. Το αντιδρών μίγμα, που περιείχε 225 μl διαλύματος καρβοξυ-μεθυλ-κυτταρίνης και 25 μl ενζυμικού διαλύματος επώαστηκε στους 50 °C σε υδατόλουτρο για 10min. Ο υπολογισμός της απελευθερούμενης γλυκόζης έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Ως 1 Unit β-1,4-ενδογλυκανάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmole γλυκόζης ανά min, στους 50 °C, σε pH 6.

### 3.5.3 β-Γλυκοζιδάσες

Η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 1 mM pNP-glucose σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM κιτρικών-φωσφορικών, pH 6. Ο ενζυμικός προσδιορισμός έγινε με επώαση στους 45°C για 10 min και οι αντιδράσεις ξεκίνησαν με την προσθήκη 50 μl ενζυμικού δείγματος σε συνολικό όγκο αντίδρασης 250 μl. Η A410 της p-νιτροφενόλης που απελευθερώνεται μετρήθηκε χρησιμοποιώντας ένα (Microplate) Φασματοφωτόμετρο της SPECTRAmax (Molecular Devices). Οι ενεργότητες εκφράζονται ως International Units (ή mU), που σημαίνει ότι 1 U καθορίζεται ως το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol νιτροφενόλης ανά λεπτό.



### 3.6 Μετρήσεις αιθανόλης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης έγινε με τη χρήση υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης (High-performance liquid chromatography (HPLC))(Shimadzu),(εικόνα 11).

Η κινητή φάση του χρωματογράφου περιείχε διαλύτη  $H_2SO_4$  (5 mM) και είχε ροή 0,6 mL/λεπτό. Η απαέρωση των διαλυτών πραγματοποιήθηκε με He που είχε ροή 30 mL/λεπτό. Χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας **Animex HPX-87H Ion Exclusion Column (BioRad)**. Επίσης έγινε χρήση ανιχνευτή RID-10A (Retractive Index Detector). Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων έγιναν με απιονισμένο νερό υψηλής καθαρότητας (Millipore, Γαλλία). Επιπροσθέτως πριν από τις αναλύσεις τα δείγματα φιλτράρονταν (0,20 mm, Macherey - Nagel).



Εικόνα 11 :Υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης (HPLC) Shimadzu

### 3.7 Ιξωδομετρία

Για τον υπολογισμό της απόδοσης των ενζύμων, κατά την διάρκεια της ρευστοποίησης, μετρήθηκε το ιξώδες του μίγματος. Για τη μέτρηση του ιξώδους χρησιμοποιήθηκε περιστροφικό ιξωδόμετρο RHEOTEST RC1 (Medingen GmbH, Radeburg, Germany) (εικόνα 12), το οποίο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Το ιξωδόμετρο περιλαμβάνει μια ηλεκτρονική μονάδα με πρότυπα DIN συστήματα ομόκεντρων κυλίνδρων για τη μέτρηση διαφορετικού εύρους ιξώδους, ένα θερμοστοιχείο Pt100 για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, ένα θερμοστατούμενο μανδύα FTK-CC (-10°C έως 90°C) και λογισμικό RHEO 2000.

Το σύστημα μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε (double gap cylinder DG DIN) αποτελείται από δύο ομόκεντρους κυλίνδρους, έναν ακίνητο (εξωτερικό) και έναν περιστρεφόμενο (εσωτερικό)



Εικόνα 12: ιξωδόμετρο RHEOTEST RC1

### 3.7.1 Ιξώδες και ρυθμός διάτμησης

Ιξώδες ορίζεται η αντίσταση των ρευστών στη ροή. Ο μαθηματικός τύπος που συνδέει το ιξώδες με το ρυθμό διάτμησης είναι ότι η διατμητική τάση ( $d$ ) είναι ίση με το γινόμενο του ιξώδους ( $\mu$ ) επί το ρυθμό διάτμησης ( $1/D$ ) υψωμένο στη  $n$  μείον ένα. [ $d = \mu \cdot (1/D)^{n-1}$ ]. Η διατμητική τάση είναι ο λόγος της δύναμης που εφαρμόζεται στο ρευστό προς την επιφάνεια εφαρμογής.

### 3.8 Υγροποίηση και παρουσίαση του Mixer

Η υγροποίηση και η σακχαροποίηση έγιναν με τη χρήση μίγματος ενζύμου, που αποτελείται από Celluclast 1,5 FG L και Novozym 188 σε αναλογία βάρους 5:1 (v/v). Η ενεργότητα αυτού του μίγματος ήταν 83 FPU / g όπως μετρήθηκε από Filter paper assay (Wood and Bhat, 1988).

Ένας αντιδραστήρας υγροποίησης σχεδιάστηκε για την υγροποίηση και την σακχαροποίηση σε στερεές συγκεντρώσεις άνω του 20% (w/w) DM. Ο αντιδραστήρας αποτελείται από δυο τοποθετημένα οριζόντια σφαιρικά τμήματα (δωμάτια). Το μοτέρ συνδέεται με ένα διαφορικό που μεταφέρει την κίνηση στα δυο δωμάτια με την ίδια φορά και ταχύτητα περιστροφής. Οι άξονες μέσα στο δωμάτια συνδέονται με τρία “φτερά”, αποσπώμενα από τον άξονα, που είναι αναγκαία για την υδρόλυση και την ανάδευση του μίγματος. Το μοτέρ 1,1 kW, που χρησιμοποιήθηκε για να δώσει κίνηση και περιστροφή στο σύστημα μετρήθηκε στις 2,5 με 16,5 rpm. Τα δωμάτια χρησιμοποιούσαν ως θερμαντικό μέσο το λάδι στο εξωτερικό μέρος του κάθε σφαιρικού τμήματος και με σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας (διπλό θερμοστάτη) έλεγχαν τη θερμοκρασία τους ξεχωριστά για το καθένα. Τέλος υπήρχε η δυνατότητα να λειτουργεί μόνο το ένα από τα δυο δωμάτια

βγάζοντας τα τρία πτερύγια και μη ενεργοποιώντας τη θέρμανση του ενός δωματίου. Σύστημα ψύξης δεν είχε εγκατασταθεί. Τα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας 0,3 kg από άχυρο (23%DM) με προσθήκη ενζύμων 5 FPU / g DM και ρυθμισμένο pH στο 5,5. Μετά από 15-30min ισορροπίας, η θερμοκρασία έφτασε το  $50 \pm 1$  °C. Ο συνολικός χρόνος παραμονής είναι 6 h. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της υγροποίησης και σακχαροποίησης ρυθμίστηκε στους  $55 \pm 1$  °C (Jorgensen et al. 2006).



Εικόνα 13:μεγαλου απλου mixer και μικρου διπλου mixer

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Προϋδρόλυση / ρευστοποίηση

### 4.1 Στάδια προϋδρόλυσης

Η διεργασία της προϋδρόλυσης πραγματοποιήθηκε στους 55<sup>0</sup>C για 6 h για τρεις διαφορετικές συνθήκες με ένζυμα 3 ,5 κ 7 FPU/gr DM αντίστοιχα . Τα στάδια προϋδρόλυσης ήταν :

1. ξήρανση του άχυρου σίτου (με σκοπό την απομάκρυνση της περιεχόμενης υγρασίας) σε φούρνο στους 65<sup>0</sup>C
2. άλεση του άχυρου, ώστε το δείγμα να είναι ομοιογενές και χωρίς μεγάλα συμπαγή κομμάτια,
3. ανάμιξη με τα εμπορικά ένζυμα Celluclast και Novozyme 188,σε αναλογία 5-1

Για την παρασκευή των μιγμάτων χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , pH=5,5

- βέλτιστο pH των εμπορικών είναι το 5. του f.oxysporum είναι το 6.Επιλεγουμε 5,5 .

Τα εμπορικά ένζυμα έχουν ως βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας στους 55 <sup>0</sup>C. Θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκε η προϋδρόλυση.

Στόχος της διαδικασίας δεν είναι η ολική υδρόλυση (η οποία συνεχίζεται κ κατά την διάρκεια της ζύμωσης(SSF) ),αλλά η ρευστοποίηση. Το σπάσιμο των μεγάλων αλυσίδων άνθρακα ,ώστε να αποδώσει καλύτερα η ζύμωση.

Με την προϋδρόλυση επιτυγχάνεται διάσπαση της δομής της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και έχουμε παραγωγή ολιγοσακχαριτών. .

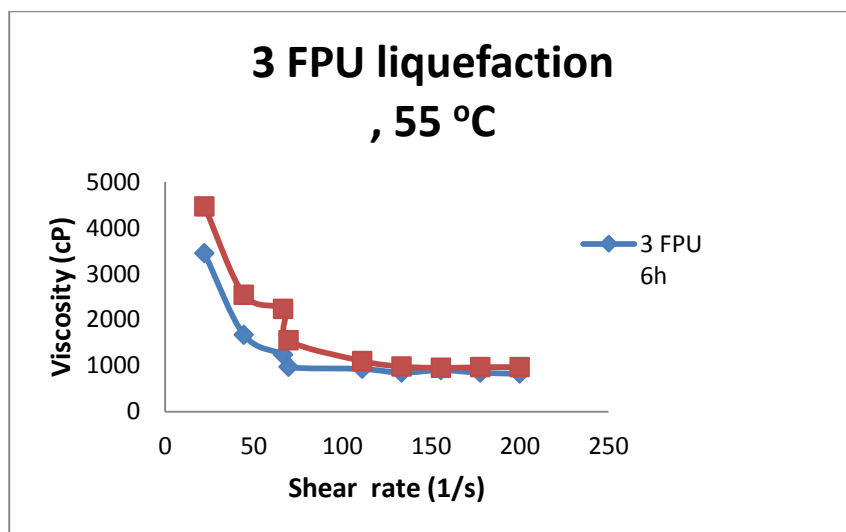
Παρατίθενται οι εικόνες από το αποτέλεσμα της προυδρόλυσης ,ανάλογα με τη ποσότητα ενζύμων που προστέθηκε σε συγκέντρωση 23% DM. Επίσης παρουσιάζονται τα διαγράμματα ιξωδες/ ρυθμός διατμησης για τις 3 κ 6 ώρες.

Αρχικά το μίγμα έχει μια άμορφη δομή .Με τη διαδικασία της ρευστοποίησης το μίγμα μετατρέπεται σε παχύρευστο υγρό. Μεγαλύτερες ποσότητες ενζύμων προκαλούν καλύτερη ρευστοποίηση ,κάτι που φαίνεται κ στη δομή κ στα αποτελέσματα της ιξωδομετρίας



Εικόνα (14) το μίγμα πριν από την προυδρόλυση, μετά την άλεση και την προσθήκη των ενζύμων .

## 4.2 Προυδρόλυση 3 mg/g DM



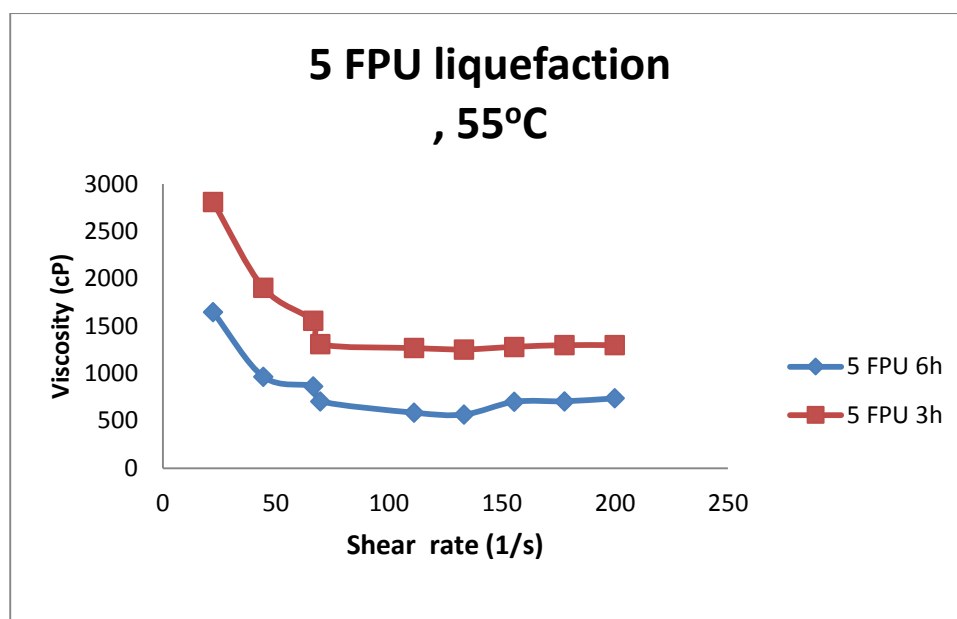
Διάγραμμα (1) διαγράμματα ιξώδες/ ρυθμός διατμησης για Εικόνα (14) Αποτέλεσμα προυδρόλυσης με 3 mg/g DM

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 1. και στις δυο περιπτώσεις τα ιξώδη είναι πάρα πολύ μεγάλα. Προφανώς με τη χρήση των 3 mg/g η προϋδρόλυση δεν έχει ολοκληρωθεί ούτε στις 3h αλλά ούτε και στις 6h. Όπως φαίνεται στην εικόνα 14 το μίγμα έχει μετατραπεί σε ένα παχύρευστο ρευστό. Η συνάρτηση ιξώδους και ρυθμού διάτμησης και των δυο δειγμάτων έχει μεγάλη κλίση μέχρι τα 75 1/s ενώ μετά τα 120 1/s παραμένει σταθερό και ίσο περίπου με 1000 cP και στις δυο γραμμές.



Εικόνα (14) αποτέλεσμα προυδρόλυσης με 3 mg/g DM 6 h

### 4.3 Προϋδρόλυση 5 mg/g DM



Διάγραμμα (2) ιξώδες/ ρυθμός διατμησης για 5 mg/g

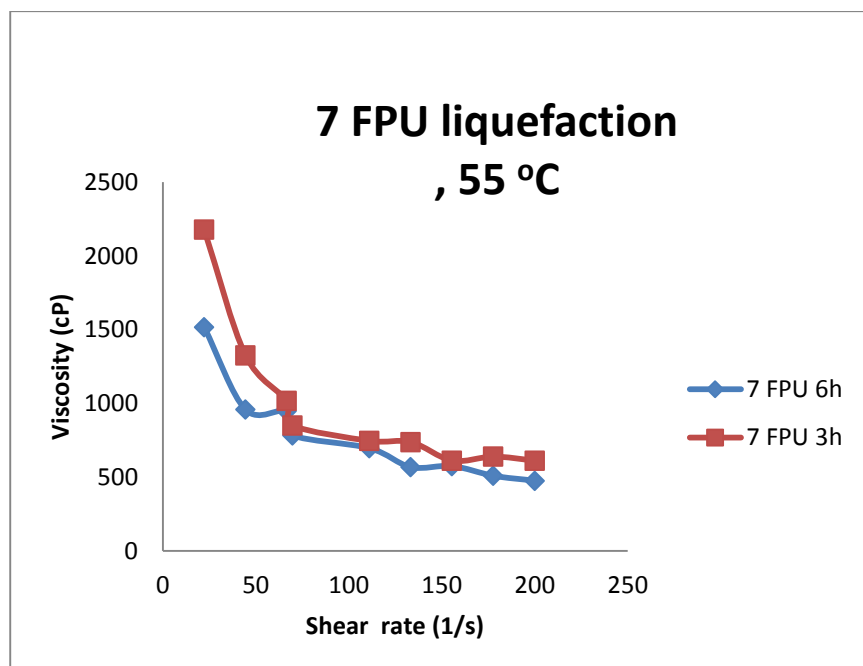
Από το διάγραμμα 2. φαίνεται ότι, η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων 3h και 6h είναι πολύ μεγαλύτερη απ ότι στα 3 mg/g . Η προϋδρόλυση στις 3h έχει πολλά σάκχαρα να προυδρολύσει . Άρα μια προϋδρόλυση με 5 FPU δε θα πρέπει να σταματά στις 3h. Στην εικόνα 15 (επόμενη σελίδα ). φαίνεται επίσης ότι προϋδρόλυση έχει προχωρήσει περισσότερο .Το υγρό έχει αποκτήσει μεγαλύτερη ρευστότητα απ ότι στα 3 mg/g . Παρατηρούμε επίσης ότι το ιξώδες 3 mg/g για τις 6 h είναι ίδιο με το ιξώδες 5 mg/g για τις 3 h. Επίσης στο διάγραμμα παρατηρείται ότι, οι κλίσεις των δυο ευθειών είναι παρόμοιες σε οποιοδήποτε ρυθμό διάτμησης. Στην αρχή έχουν την ίδια κλίση και η μείωση του ιξώδους είναι ο ρυθμός μείωσης του ιξώδους είναι ο ίδιος και στα δυο δείγματα. Όταν ο ρυθμός διάτμησης φτάσει όμως περίπου στο 75 1/s και στα δυο δείγματα το ιξώδες παραμένει σταθερό (το δείγμα των 3h κοντά στα 1500 cP και στο δείγμα των 6h στα 750 cP).





Εικόνα (15): Αποτέλεσμα προυδρόλυσης με 5 mg/g DM

#### 4.4 Προυδρόλυση 7 mg/g DM



Διάγραμμα (3) ιξώδες/ ρυθμός διατμησης για 7 mg/g

Παρατηρείται ότι, το αρχικό ιξώδες (των 6h προυδρολύσης) είναι πολύ πιο χαμηλό από αυτό των 3h, γεγονός απόλυτα λογικό αφού το δείγμα έχει προυδρολυθεί επιπλέον 3h. Στην εικόνα 16 (επόμενη σελίδα ) παρατηρούμε σημαντική διαφορά στην εμφάνιση ανάμεσα στα 3 mg/g και στ 7 . Διαφορά φαίνεται ακόμα και μεταξύ των 5mg/g κ των 7 mg/g. Η κλίση της ευθείας στο αρχικό κομμάτι και των δυο δειγμάτων είναι αρκετά μεγάλη, με μεγαλύτερη αυτή του δείγματος των τριών ωρών. Όταν ο ρυθμός διάτμησης ξεπερνά τα 150 1/s το δείγμα των 3 ωρών σταθεροποιείται ενώ στο άλλο δείγμα συνεχίζει να μικραίνει το ιξώδες του έστω και με πολύ αργό ρυθμό. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι, η προυδρόλυση είχε προχωρήσει σε ικανοποιητικό βαθμό στις τρεις ώρες. Επίσης οι γραμμές των 5 και 7 mg/g στις 6h είναι σχεδόν πανομοιότυπες, γεγονός που αποδεικνύει ότι η μέγιστη προυδρόλυση έχει ολοκληρωθεί.



Εικόνα (16) Αποτέλεσμα προυδρόλυσης με 7 mg/g DM

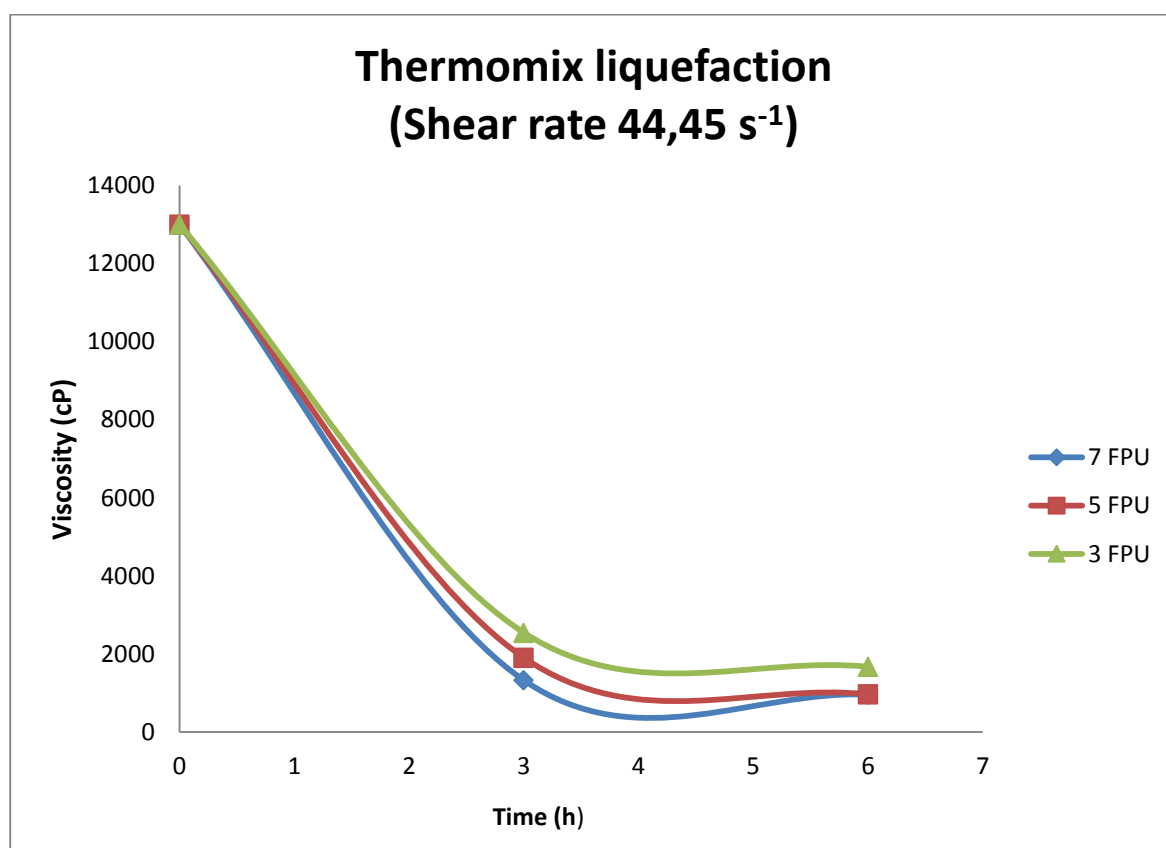
Συγκεντρωτικά παρατηρούμε ότι στην περίπτωση των 3 mg/g η υδρόλυση δεν έχει προχωρήσει αρκετά καθώς βλέπουμε να συμπίπτουν τα αποτελέσματα για τις 3 κ τις 6 ώρες.

Στην περίπτωση των 5 κ 7 mg/g η υδρόλυση για τις 6 ώρες έχει σημαντική διαφορά με αυτή που παρατηρείται στις 3.

## 4.5 Σύγκριση

Το αποτέλεσμα της προϋδρόλυσης με διαφορετικές ποσότητες θερμοενζύμων φαίνεται :

- 1) από το συνολικό διάγραμμα ιξώδους /χρόνου για διαφορετικά FPU.



Διάγραμμα (4) ιξώδες /χρόνος (για διαφορετικά FPU)

Ένας δείκτης για το πόσο έχει προχωρήσει η υδρόλυση είναι το κατά πόσο το μίγμα έχει ρευστοποιηθεί και ομογενοποιηθεί. Επίσης, όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός απόδοσης της προϋδρόλυσης, τόσο μικρότερο είναι το ιξώδες.

Η υδρόλυση για το δείγμα με τα 7 mg/g έχει ολοκληρωθεί πριν τις 6h, για το δείγμα με τα 5 mg/g οι 6h επαρκούν και γίνεται σε ικανοποιητικό βαθμό η προϋδρόλυση και τέλος για το δείγμα με τα 3 mg/g η ρευστοποίηση είναι σε πολύ μικρά επίπεδα .

2) από τον πίνακα (4) με τα αποτελέσματα

	<b>7 FPU</b>	<b>5 FPU</b>	<b>3FPU</b>
<b>συνολικά σακχαρα (g/L)</b>	121,00	121,00	121,00
<b>υδρολυμενα σακχαρα (g/L)</b>	70,60	54,70	23,60
<b>ποσοστο υδρολυμενων σακχαρων %</b>	58,35	45,21	19,50
<b>υδρολυμενη γλυκοζη (g/L)</b>	38,50	25,10	14,60
<b>υδρολυμενη ξυλοζη (g/L)</b>	8,20	5,40	3.20

*Πινάκας (4):* ποσοτήτων και ποσοστών σακχάρων, γλυκόζης και ξυλόζης μετά από προϋδρόλυση με τη χρήση θερμοενζύμων στους 55°C

Από τον πίνακα φαίνεται ότι με τη προϋδρόλυση στους 55°C με 7 mg/g από τα συνολικά σάκχαρα του δείγματος απελευθερώθηκε περίπου το 60% των συνολικών. Παρατηρείται ότι οι ποσότητες των υδρολυμένων σακχάρων μειώνονται γραμμικά ανάλογα με τα mg/g. Από τα συνολικά υδρολυμενα σάκχαρα και στα τρια πειραματα το 53 με 55 % είναι γλυκόζη και το 10 με 12 % ξυλόζη, οι οποίες αποτελούν πρώτη υλη για την μετέπειτα ζύμωση σε αιθανόλη. Οι ποσότητες αυτες δείχνουν οτι υπάρχουν πολλά σάκχαρα το οποία δεν έχουν μετατραπεί σε γλυκόζη και ξυλόζη και άρα θα πρέπει να ερευνηθεί άυξηση της απόδοσης της προϋδρόλυσης.

Η διαδικασία της ζύμωσης πραγματοποιείται στους 30 βαθμούς. Τα θερμοένζυμα στους 30 βαθμούς έχουν σταματήσει την λειτουργικότητα τους. Για το λόγω αυτό θα προστεθούν ένζυμα F.ox. τα οποία στη συγκεκριμένη θερμοκρασία έχουν το ¼ της απόδοσης που έχουν στους 55 βαθμούς. Έτσι η υδρόλυση θα συνεχιστεί κ στην διαδικασία της ζύμωσης κ θα απελευθερωθούν κ τα υπόλοιπα σάκχαρα που δεν είχαν προυδρολυθεί.

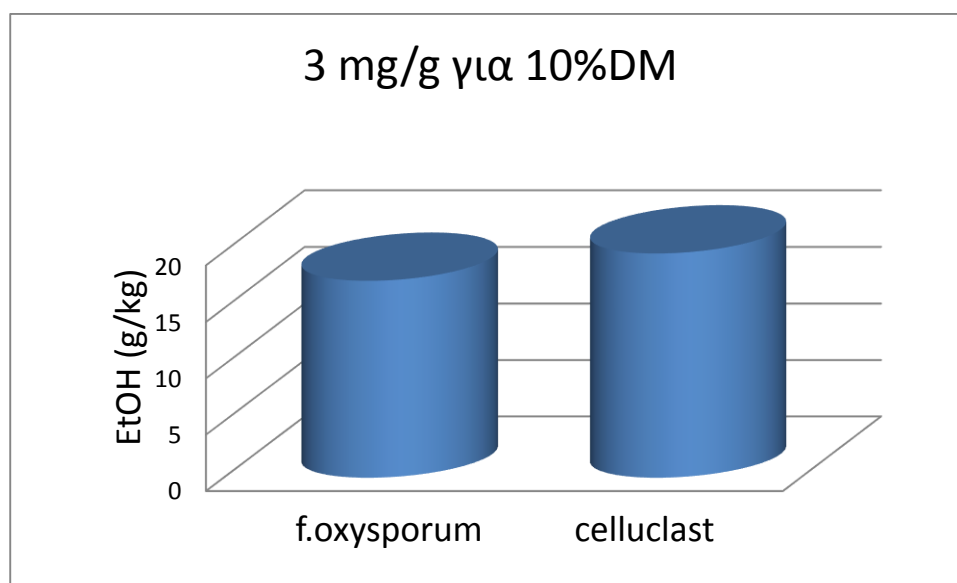
Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι για προσθήκη 3 mg/g η υγροποίηση είναι σχετικά μικρη ,ενώ για 5 κ 7 mg/g είναι σε ικανοποιητικά επίπεδα. Θα επιλέξουμε τα

**5 mg/g** διότι έχουμε ικανοποιητική υδρόλυση [ Sontag-Strohm, Viikari et.al.2010], [Viamajala, McMillan, Elander et.al 2007] κ δεν θα ξεπεράσουμε το όριο των 10 mg/g όταν προσθέσουμε τα υπόλοιπα ένζυμα (F.ox ,celluclast).

## 4.6 Παραγωγή αιθανόλης

Στα παρακάτω αποτελέσματα όπως αναφέραμε πιο πάνω επιλέγουμε για τα θερμοένζυμα τα 5 mg/g ,καθώς δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα [ Sontag-Strohm, Viikari et.al.2010], [Viamajala, McMillan, Elander et.al 2007].Μετράμε την παραγωγή αιθανόλης με προσθήκη επιπλέον διαφορετικών ποσοστών ενζύμων κ σε διαφορετικά DM.

### 4.6.1 5 mg/g thermomix + 3 mg/g ένζυμα 10% DM



Γράφημα 1 .Παραγωγή αιθανόλης από 5 mg/g thermomix + 3 mg/g ένζυμα σε 10% DM

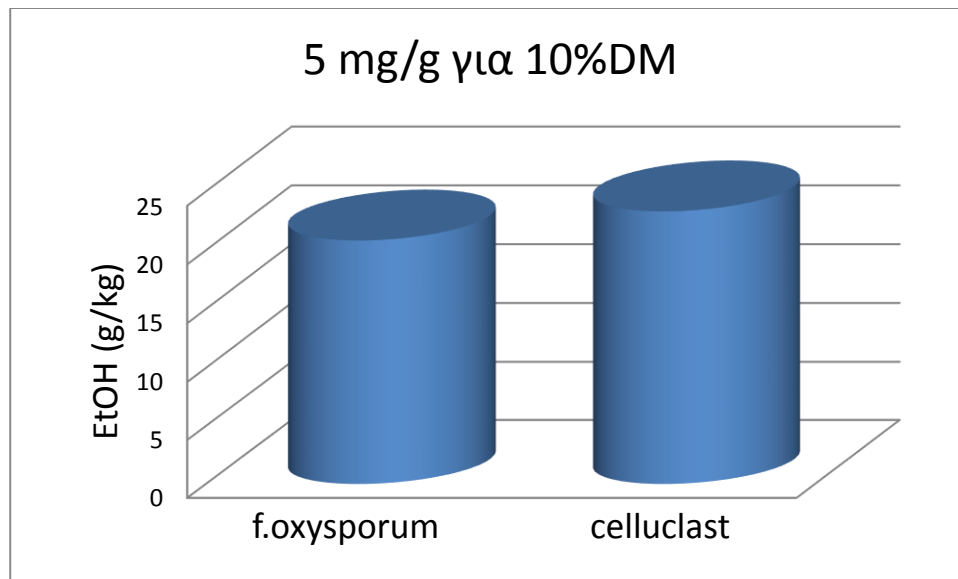
Από το γράφημα 1, παρατηρούμε ότι η παραγωγή αιθανόλης με προσθήκη :

3 mg/g F.oxysporum είναι 17,454 g.

3 mg/g celluclast είναι 19,866 g.

Η **διαφορά** στην απόδοση είναι της τάξης του **12,1 %**.

#### 4.6.2 5 mg/g thermomix + 5 mg/g ένζυμα 10% DM



Γράφημα 2 .Παραγωγή αιθανόλης από 5 mg/g thermomix + 5 mg/g ένζυμα σε 10% DM

Από το γράφημα 2, παρατηρούμε ότι η παραγωγή αιθανόλης με προσθήκη

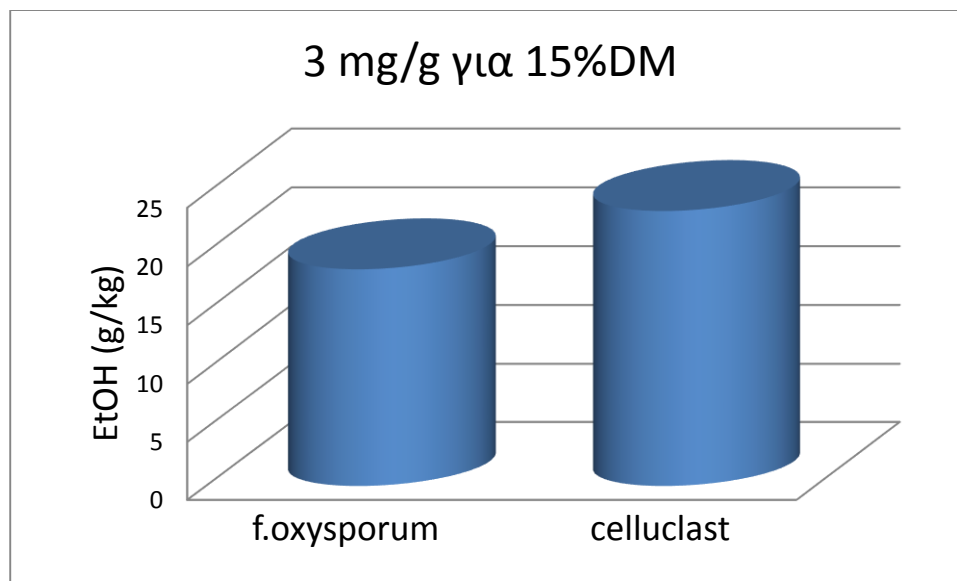
5mg/g F.oxysporum είναι 20,84 g.

5mg/g celluclast είναι 23,319 g.

Η **διαφορά** στην απόδοση είναι της τάξης του **10,6%**.



#### 4.6.3 5 mg/g thermomix + 3 mg/g ένζυμα 15% DM



Γράφημα 3 .Παραγωγή αιθανόλης από 5 mg/g thermomix + 3 mg/g ένζυμα σε 15% DM

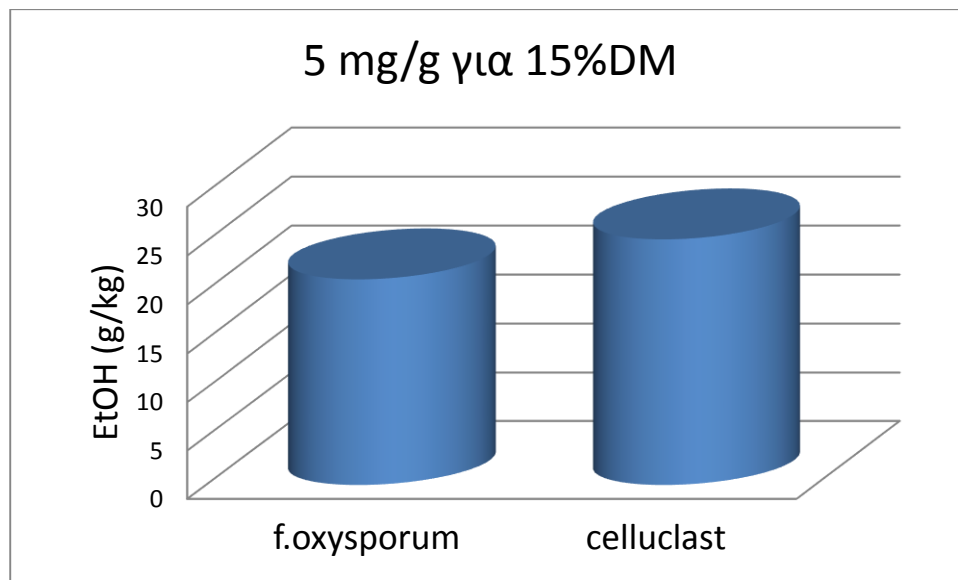
Από το γράφημα 3 παρατηρούμε ότι η παραγωγή αιθανόλης με προσθήκη

3 mg/g F.oxysporum είναι 18,565 g.

3 mg/g celluclast είναι 23,521 g.

Η **διαφορά** στην απόδοση είναι της τάξης του **21%**.

#### 4.6.4 5 mg/g thermomix + 5 mg/g ένζυμα 15% DM



Γράφημα 4 .Παραγωγή αιθανόλης από 5 mg/g thermomix + 5 mg/g ένζυμα σε 15% DM

Από το γράφημα 4 παρατηρούμε ότι η παραγωγή αιθανόλης με προσθήκη

5mg/g F.oxysporum είναι 21,149 g.

5mg/g celluclast είναι 25,23 g.

Η **διαφορά** στην απόδοση είναι της τάξης του **16 %**.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Σχολιασμός –Προτάσεις

Παρατηρούμε ότι κ στις δύο περιπτώσεις η προσθήκη μεγαλύτερου ενζυμικού φορτίου φέρει κ μεγαλύτερη απόδοση σε αιθανόλη. Η αύξηση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι η παρουσία περισσοτέρων ενζύμων στο σύστημα αυξάνει τον βαθμό της υδρόλυσης των υπολοίπων σακχάρων που δεν έχουν υδρολυθεί. Ταυτόχρονα με την ζύμωση, απελευθερώνονται, εκ νέου, ελεύθερα σάκχαρα, τα οποία είναι διαθέσιμα για ζύμωση. Με αύξηση του αριθμού των ελεύθερων σακχάρων στο σύστημα συνεπάγεται αύξηση στην ποσότητα της παραγόμενης αιθανόλης.

Με αύξηση της ξηρής μάζας συνεπάγεται αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης. Η αύξηση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι όσο αυξάνεται το ποσοστό του Dry Matter το σύστημα γίνεται πιο «πλούσιο» στους πολυσακχαρίτες κυτταρίνης, ημι-κυτταρίνης και λιγνίνης. Εφόσον υπάρχει περισσότερη πρώτη ύλη είναι αναμενόμενη η αυξημένη παραγωγή αιθανόλης.

Το ποσοστό της αιθανόλης που παράγεται με την προσθήκη 5 mg/g celluclast για 10% DM είναι ίδιο με αυτό που παράγεται με την προσθήκη 3mg/g για 15% DM

Τα ένζυμα του *F. oxysporum* υδρολύουν ικανοποιητικά τον πολυσακχαρίτη της ημικυτταρίνης (συγκριτικά με τα εμπορικά ένζυμα) συνεπώς προτιμώνται σε άχυρο με μεγάλο ποσοστό ημικυτταρίνης

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου αυξάνει την απόδοση της ζύμωσης με παράλληλη υδρόλυση οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή αιθανόλης.

Σε 10% DM κ 5mg/g ο *F.ox.* δίνει πολύ κοντινά αποτελέσματα με το celluclast . Στις υπόλοιπες συνθήκες τα αποτελέσματα έχουν μια διαφορά ,αλλά όχι τέτοια που να μας αποτρέπει την χρήση του *F.ox.* έναντι των εμπορικών ενζύμων

Βασικός παράγοντας για να επιτευχθεί μεγάλος βαθμός απόδοσης της ζύμωσης είναι η προυδρολύση ώστε να υπάρχουν αρκετά ελεύθερα σάκχαρα να ζυμωθούν σε αιθανόλη.

Η διαδικασία της προυδρολύσης για να ολοκληρωθεί πλήρως χρειάζεται τουλάχιστον έξι ώρες για 5 και 7 mg/g και παραπάνω από 6 ώρες για 3 mg/g

Ο μικροοργανισμός F.ox. είναι κατάλληλος σε διεργασίες ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης

Χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση της λειτουργίας του F.ox σε άλλες συνθήκες .Ο F.ox μπορεί κ συνεχίσει την υδρόλυση παράλληλα με την ζύμωση .Αρα χρειάζεται μελέτη σε κ σύγκριση αποτελεσμάτων σε μεγαλύτερα ποσοστά DM από το 15% που μελετήσαμε στην εργασία μας

## Βιβλιογραφία

1. A. Demirbas (2008): *The Importance of Bioethanol and Biodiesel from Biomass*, Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy, 3:2, 177-185.
2. Bioenergy International Magazine, No 51, April 2011, page 21
3. Boerrigter, H., Galis, H.P., Slort, D.J., and Bodenstaff, H., Gas Cleaning for Integrated Biomass Gasification (BG) and Fischer-Tropsch (FT) Systems; Experimental Demonstration of Two BG-FT Systems, Presented at the 2<sup>nd</sup> World Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection, Rome, Italy, May 2004.
4. Christakopoulos P., Macris B.J., Kekos D. Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. Enzyme and Microbial Technology 11, pp. 236-239, 1989.
5. Demirbas A. Ethanol from cellulosic biomass resources. Int J Green Ener 1, pp. 79–87, 2004
6. Demirbas, A., 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. Energy sources 27, 327–337.
7. FAO, 2009. Small-Scale Bioenergy Initiatives: Brief Description and Preliminary Lessons on Livelihood Impacts from Case Studies in Asia, Latin America and Africa. Food and Agricultural Organization, Rome. Available at <http://www.fao.org/docrep/011/aj991e/aj991e00.htm>.

8. Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irini Angelidaki (2009), Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation.
9. Fernanda da Cunha-Pereira, Lilian Raquel Hickert, Nicole Teixeira Sehnema, Priscila Brasil de Souza-Cruz, Carlos Augusto Rosa, Marco Antônio Záchia Ayub, (2010),
10. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations
11. Galbe, M., Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 618–628.
12. Garcia-Cubero, M.T., Gonzalez-Benito, G., Indacoechea, I., Coca, M., Bolado, S., 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology* 100, 1608–1613.
13. Gianni Panagiotou, Evangelos Topakas, Maria Moukouli, Paul Christakopoulos, Lisbeth Olsson, (2011), Studying the ability of *Fusarium oxysporum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to efficiently cooperate in decomposition and ethanolic fermentation of wheat straw
14. Gianni Panagiotou, Evangelos Topakas, Maria Moukouli, Paul Christakopoulos, Lisbeth Olsson, 2011, Studying the ability of *Fusarium oxysporum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to efficiently cooperate in decomposition and ethanolic fermentation of wheat straw
15. Hendriks, A., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100, 10–18
16. Jian Xu\*, Mette Hedegaard Thomsen, Anne Belinda Thomsen Ethanol production from hydrothermal pretreated corn stover with a loop reactor

17. Jost Marva Cerveroa, Pernille Anastasia Skovgaardb, Claus Felbyb, 2009  
Enzymatic hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake for  
production of bioethanol
18. Kerstetter, J.D., Lyons, J.K., 2001. Wheat Straw for Ethanol Production in  
Washington: A Resource, Technical, and Economic Assessment. Washington  
State University Cooperative Extension. <[http://www.energy.wsu.edu/  
documents/renewables/WheatstrawForEthanol.pdf](http://www.energy.wsu.edu/documents/renewables/WheatstrawForEthanol.pdf)>.
19. Kim, H-J., Kang, B-S., Kim, M-J., Park, Y.M., Kim, D-K, Lee, J-S., Lee, K-  
Y., Transesterification of vegetable oil to biodiesel using heterogeneous base  
catalyst, *Catalysis Today*, 93-95, 315-320, 2004
20. Klinke, H.B., Ahring, B.K., Schmidt, A.S., Thomsen, A.B., 2002.  
Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat  
straw. *Bioresource Technology* 82, 15–26.
21. Kristensen, J.B., Borjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F., Jorgensen, H., 2007.  
Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw  
lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 888–895.
22. Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005.  
Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. In:  
Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, pp.  
1081–1099.
23. Lee, J., 1997 Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol, *J.  
Biotechnology*, 56, p.1-24, 1997
24. Machado Filho, H., Steps taken in the Brazilian Energy and Transportation  
Sectors that Contribute to the Ultimate Objective of the UNFCCC. Ministry  
of Science and Technology of Brazil, 2000

25. Mai Østergaard Petersena, Jan Larsena, Mette Hedegaard Thomsenb, (2009), Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals
26. Mette Hedegaard Thomsen, Anders Thygesen, Anne Belinda Thomsen, (2008), Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis
27. M. Galbe, G. Zacchi (2002): *A review of the production of ethanol from softwood*. Appl Microbiol Biotechnol 59:618–628
28. Okano, K., Kitagawa, M., Sasaki, Y., Watanabe, T., 2005. Conversion of Japanese redcedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. Animal Feed Science and Technology 120, 235–243.
29. Panagiotou, G., Olsson, L., 2007. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. Biotechnology and Bioengineering 96 (2), 250–258.
30. Panagiotou G., Christakopoulos P., Olsson L (2005 $\alpha$ ). The influence of different cultivation conditions on the metabolome of *Fusarium oxysporum*. Journal of Biotechnology 118:304-315
31. Panagiotou G., Christakopoulos P., Olsson L. (2005 $\beta$ ). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *Fusarium oxysporum* F3-growth characteristics and metabolite profiling. Enzyme and Microbial Technology 36:693-699
32. Panagiotou G., Christakopoulos P., Villas-Boas S.G., Olsson L. (2005 $\gamma$ ). Fermentation performance and intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on a glucose-xylose mixture. Enzyme and Microbial Technology 36:100-106



33. Panagiotou G., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P. (2003). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* 18:37-45
34. Panagiotou G., Villas-Boas S.G., Christakopoulos P., Nielsen J., Olsson L. (2005δ). Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol. *Journal of Biotechnology* 115:425-434
35. .Sudhagar, M., Tabil, L.G., Sokhansanj, S., 2004. Grinding performance and physical properties of wheat and barley straws, corn stover and switchgrass. *Biomass and Bioenergy* 27, 339–352.
36. Summersa M D, Jenkinsa B M, Hydeb P R, Williamsc J F, MuttersdR G, Scardaccie S C, Haire M W. Biomass production and allocation in rice with implications for straw harvesting and utilization. *Biomass and Bioenergy*, 2003, 24(3): 163–173
37. Thygesen, A., Oddershede, J., Lilholt, H., Thomsen, A.B., Sta °hl, K., 2005. On the determination of crystallinity and cellulose content in plant ?bres. *Cellulose* 12, 563–576.
38. Wayne W Fish Watermelon juice: a promising feedstock supplement, diluent, and nitrogen supplement for ethanol biofuel production *Biotechnology for Biofuels*.
39. Ye Sun, Jiayang Cheng (2002): *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. *Bioresource Technology* 83, 1-11
40. Yong Tang, Danqing Zhao, Carrasco Cristhian and Jianxin Jiang, (2011), Simultaneous saccharification and cofermentation of lignocellulosic residues from commercial furfural production and corn kernels using different nutrient media
41. Καραμάνος Α., (1992), «Τα σιτηρά των Εύκρατων Κλιμάτων», Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών, Αθήνα.
42. Παπαιωανου Αγγελος, 1996, μηχανικη των ρευστων τομος 1

43. . Ξηρός Χ. Αξιολόγηση του ενζυμικού κ μικροβιακού συστήματος του μύκητα *Fuzarium Oxysporum* για την βιομετατροπή κυτταρινούχων κ ημικυτταρινούχων αγροτοβιομηχανικών παραπροϊόντων. 2009
44. Χριστακόπουλος Π. Τόπακας Ε. Βιοτεχνολογία παραγωγής Βιοκαυσίμων 2010